

Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Exactas
Departamento de Ciencias Biológicas



Biblioteca Central
Fac. Cs. Exactas
U.N.L.P.

**Farmacología de compuestos de
vanadio. Efectos sobre células
osteoblásticas en cultivo.**

TESIS
Nº 1071

Tesis Doctoral

Farmacéutico Daniel Alejandro Barrio

2004

UBIACI ON.....

Fecha.....

07-04-03

Inv. S.....

Inv.....

51397

Farmacología de compuestos de vanadio. Efectos sobre células osteoblásticas en cultivo.



Biblioteca Central
Fac. Cs. Exactas
U.N.L.P.

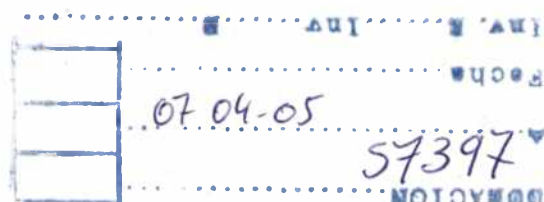


TESIS
Nº 1071

Daniel Alejandro Barrio

2004

Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Exactas
Departamento de Ciencias Biológicas



El presente trabajo de tesis para optar al grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas, fue realizado en la Cátedra de Bioquímica Patológica del Departamento de Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección de las Prof. Dr. Susana B. Etcheverry y Ana M. Cortizo.

Diciembre de 2004

AGRADECIMIENTOS

A mis Directoras:

Susana B. Etcheverry por enseñarme, guiarme y apoyarme en esta etapa de mi formación. Por enseñarme que los aspectos formales y rigurosos de la investigación son esenciales para lograr los objetivos. Por saber que siempre está cuando la necesito. Por su cariño incondicional. Por transmitirme su perseverancia que me sirvió de aliento cada uno de estos días en el laboratorio.

Ana M. Cortizo por aconsejarme, asesorarme y enseñarme durante estos años de dura tarea experimental e intelectual. Por enseñarme a pensar con los pies en la tierra y a mirar las cosas con un sentido crítico. Por transmitirme su pasión por la investigación. Por su cariño de todos los días, sus consejos y su amena compañía.

Gracias Nené y Nana...

A la Facultad de Ciencias Exactas que me brindó la posibilidad de aprender una profesión y desarrollar mi tesis doctoral; por enseñarme a pensar y a ser crítico; por enseñarme que la solidaridad, la igualdad y la humildad son ideales fundamentales por los cuales luchar todos los días.

A la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires por otorgarme la beca que me permitió concluir esta tesis.

Al Colegio de Farmacéuticos de la Provincia de Buenos Aires por otorgarme la beca que me permitió iniciar este hermoso proyecto de tesis.

A mi esposa que me acompañó y me apoyó durante estos años. Por su amor incondicional, su cariño infinito y su ternura. Por alentarme cuando bajaba los brazos. Por soportar que los fines de semana nos quedáramos en casa para escribir la tesis o acompañarme los domingos a la facultad a atender las células. Gracias vida...

A mi familia por su apoyo incondicional. Por el esfuerzo enorme que hicieron para que yo estudiara, por estar siempre ahí y saber que cuento con ellos, por su amor y su cálida compañía. Gracias a todos, Papi, Mami, Sandrusky, Naty y Noe.

A mis suegros el Dr. Raúl Coniglio y Carmen Freundlich por sus buenos consejos para la tesis, por las cosas lindas que nos unen; por su apoyo, confianza y cariño incondicional.

Al Prof. Dr. Alberto Fosatti y a la Prof. Dra. María C. Añon por dejarme hacer, por su apoyo inagotable, por su confianza, por su ejemplo, su cariño y amistad.

A la Prof. Dra Patricia A. M. Williams por su gran y valiosa contribución a los resultados de esta tesis.

A mis tíos y familia: Horacio, Enrique, Raúl y Rubén que me apoyaron de alguna forma para que terminara mi carrera de grado.

A mis compañeros de laboratorio: Antonio, Natalia, Silvina, Adriana, Gustavo, Cecilia, Guillermo, Gabriela, Wendy y Diego con quienes compartí lindos momentos en la Cátedra de Bioquímica Patológica. Gracias Natalia y Silvina por la foto de la tapa y gracias a Uds. y Antonio por poder compartir mis dudas, resultados y pequeños logros de todos los días en el laboratorio.

A mis amigos: Faca, Juan Marcos, Tatín, Tatón, Diego, Aldo, Martín, Piqui, Franco, Toni, la Flaca y el Negro por tantos momentos lindos compartidos, por su amistad, por todo lo que compartimos y nos hizo grandes por dentro.

A mis amigos Mendocinos por su amistad y buenos momentos compartidos.

A mis compañeros de la cátedra de Bromatología con quienes compartí largos días de lunes y miércoles dando clases.

A los investigadores y personal de apoyo del CIDCA por su colaboración, compañerismo y buena predisposición.

Al Movimiento Nacional Reformista por compartir la idea de la Universidad Pública, Gratuita, Laica, sin restricciones y abierta a quienes deseen enseñar, investigar y estudiar.

Al Prof. Dr. Anibal G Bibiloni por su ejemplo y sus consejos.

A los Prof. Dres. Jorge Wagner, Nestor Caffini, Graciela de Antoni, Pablo Lufrano, Angela Grassi por su ejemplo y el apoyo brindado.

Al Prof Dr. Gerardo R Vasta por donarnos los inhibidores de las vías que estudié en esta tesis.

A la Prof. Dra. Nilda Fink por donarme el PMA que utilicé en esta tesis.

A los no docentes de la facultad y en especial a Aldo, Leticia y Susana por su apoyo y amistad.

A Carlos Bianchi, el Diego, Marcos DiPalma, los Enanitos Verdes y José Hernandez por las alegrías, los buenos momentos vividos y su enseñanza.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

1. DIABETES MELLITUS	Páginas
1.1. Aspectos generales de la Diabetes mellitus	1
1.1.1. Fisiopatología y clasificación	1
1.1.2. Incidencia e impacto socioeconómico	2
1.2. Mecanismo de acción de la insulina.	2
1.2.1. Receptor de insulina.	3
1.2.2. Cascada de las MAPKs.	6
1.2.2.1. Generalidades.	6
1.2.2.2. Regulación de MAPKs	8
1.2.2.3. Cascada de las ERKs y sus mecanismos regulatorios.	9
1.2.2.3.1. Consecuencias biológicas de la activación de la vía de las ERKs.	13
1.2.3. Cascada de la PI3-K.	17
1.2.3.1. Activación de la PI3-K.	18
1.2.3.2. Mecanismo de transducción de señales disparado por la PI3-K.	18
1.2.3.3. Consecuencias biológicas de la activación de la PI3-K.	20
1.3. Tratamiento farmacológico de la Diabetes mellitus.	22
1.3.1. Tratamiento con insulina.	22
1.3.2. Últimos avances en el tratamiento de la Diabetes mellitus.	22
1.3.3. Hipoglucemiantes orales.	24
1.3.4. Terapias alternativas para el tratamiento de la Diabetes mellitus.	25

2. DIABETES Y VANADIO.

2.1. Antecedentes históricos y relevancia farmacológica de los complejos de vanadio.	26
2.2. Química del vanadio.	28
2.2.1. Descubrimiento y fuentes.	28
2.2.2. Propiedades fisicoquímicas del vanadio.	29
2.2.3. Química del vanadio (IV).	30
2.2.4. Química del vanadio (V).	31
2.2.5. Caracterización y detección de vanadio en sistemas acuosos, sólidos y biológicos.	32
2.3. El vanadio en sistemas biológicos.	33
2.3.1. Acciones biológicas del vanadio <i>in vitro</i> .	34
2.3.1.1. Inhibición enzimática.	34
2.3.1.2. Activación enzimática.	36
2.3.1.3. Efectos celulares del vanadio.	36
2.3.1.3.1. Efectos del vanadio sobre la fosforilación de proteínas en células en cultivo.	37
2.3.1.3.2. Efectos del vanadio sobre la proliferación de células en cultivo.	38
2.3.1.3.3. Efectos del vanadio sobre la diferenciación de células en cultivo.	42
2.3.1.3.4. Efectos del vanadio sobre el metabolismo de células en cultivo.	43
2.3.1.3.5. Transformaciones morfológicas causadas por el vanadio en sistemas celulares.	45
2.3.2. Acciones biológicas del vanadio <i>in vivo</i> .	46
2.4. Acciones farmacológicas del vanadio <i>in vivo</i> .	49
2.4.1. Estudios en animales de experimentación.	49

2.4.2. Estudios en humanos.	52
2.5. Toxicidad.	56
2.6. Importancia de la complejación del vanadio.	58
2.7. El vanadio en el hueso.	58

3. FISIOLÓGIA DE LOS OSTEÓBLASTOS

3.1. Factores de crecimiento producidos por osteoblastos.	60
3.2. Modelos de células de tipo osteoblasto murino.	61

OBJETIVOS 67

MATERIALES Y MÉTODOS

1. SÍNTESIS DE COMPUESTOS DE VANADIO.

1.1. Complejos de vanadilo(IV) con diferentes ligandos.	69
1.1.1. Monosacáridos	69
1.1.2. Disacáridos	69
1.1.3. Polioles lineales	69
1.1.4. Polialcoholes cíclicos	69
1.1.5. Ácidos polihidroxilados	70
1.2. Características estructurales de los complejos del catión vanadilo(IV)	70

2. ESTUDIOS BIOLÓGICOS

2.1. Estudios acelulares	71
2.1.1. Preparación de extractos celulares	71
2.1.2. Ensayo de inhibición de la actividad de fosfatasas	72
2.2. Estudios celulares	72
2.2.1. Cultivos celulares.	72

2.2.2. Ensayo de proliferación celular.	73
2.2.3. Bioensayo del Cristal violeta.	73
2.2.4. Ensayos de diferenciación celular.	74
2.2.4.1. Actividad específica de FAL.	74
2.2.4.2. Determinación de colágeno	74
2.2.5. Consumo de glucosa por los osteoblastos.	75
2.3. Estudios morfológicos.	75
2.3.1. Tinción con Giemsa.	75
2.3.2. Estudios del citoesqueleto por Inmunofluorescencia.	76
2.4. Estudios de mecanismos de acción	76
2.4.1. Ensayo de Western blot	76
2.4.2. Ensayos con inhibidores	77

3. TÉCNICAS AUXILIARES

3.1 Determinación de proteínas por el método de Bradford.	78
---	----

4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	78
--------------------------	----

RESULTADOS.

1. Efecto del vanadio sobre la actividad específica de fosfatasa alcalina intestinal y ósea.	79
1.1. Fosfatasa alcalina de origen intestinal.	79
1.2. Fosfatasa alcalina de origen óseo.	82
2. Efectos del vanadio sobre la proliferación de osteoblastos UMR106 y MC3T3-E1.	84
2.1. Osteoblastos UMR106	84
2.2. Preosteoblastos MC3T3-E1	87

3. Efectos del vanadio sobre la diferenciación de los osteoblastos UMR106.	89
3.1. Efectos del vanadio sobre la actividad específica de FAL en osteoblastos UMR106.	89
3.2. Efecto del vanadio sobre la producción de colágeno por las células UMR106	93
3.3. Efecto del vanadio sobre el consumo de glucosa por los osteoblastos.	94
4. Alteraciones morfológicas	97
4.1. Alteraciones morfológicas observadas en la tinción con Giemsa.	97
4.2. Inmunofluorescencia	101
4. Efectos del complejo de vanadio(IV) con trehalosa sobre el desarrollo osteoblástico de las células MC3T3-E1	104
5.1. Proliferación celular	105
5.2. Diferenciación de las células MC3T3-E1. Actividad específica de FAL, contenido de proteínas totales y colágeno.	106
5.3. Consumo de glucosa	109
5.4. Mineralización	111
6. MECANISMOS DE ACCIÓN	112
DISCUSIÓN	126
CONCLUSIONES	146
REFERENCIAS	148
PUBLICACIONES A LAS QUE HA DADO ORIGEN EL PRESENTE TRABAJO DE TESIS	189

Introducción

“Aquí me pongo a cantar
Al compás de la vigüela,
Que el hombre que lo desvela
Una pena extraordinaria
Como el ave solitaria
Con el cantar se consuela.”

José Hernández. Verso 1

INTRODUCCIÓN

1. DIABETES MELLITUS

1.1. Aspectos generales de la Diabetes mellitus

1.1.1. Fisiopatología y clasificación

La Diabetes mellitus (**DM**) es un conjunto de síndromes caracterizados por hiperglucemia, alteraciones del metabolismo de los hidratos de carbono, lípidos y proteínas. Se sospecha DM ante la presencia de los siguientes síntomas clínicos: poliuria, polidipsia, polifagia y alteración del peso corporal. Se diagnostica con el hallazgo de hiperglucemia en ayunas o por la prueba de tolerancia oral a la glucosa. La enfermedad puede clasificarse etiológicamente en Diabetes mellitus de tipo 1, de tipo 2, otros tipos específicos y Diabetes mellitus gestacional (DMG) (Expert Committee 1997).

La Diabetes mellitus de tipo 1 se caracteriza por destrucción de las células β del páncreas, que generalmente conduce a un déficit absoluto de insulina. Esa destrucción puede ser inmunomediada y en algunos casos es una enfermedad idiopática. La Diabetes mellitus de tipo 2 puede abarcar desde una insulinoresistencia predominante sumada a una deficiencia relativa de insulina, hasta un predominio de un defecto en la secreción de la hormona con insulinoresistencia. Los otros tipos específicos de Diabetes mellitus incluyen defectos genéticos en la función de la célula β , defectos genéticos en los mediadores de la acción de la insulina, enfermedades del páncreas exócrino y endocrinopatías, entre los más importantes.

Además de los componentes genéticos, actuarían factores ambientales ya que en gemelos idénticos se ha observado una tasa de concordancia del 25 al 50 %. Casi todas las formas de Diabetes mellitus se deben a una disminución absoluta o relativa de la insulina circulante (deficiencia de insulina), a una falta de respuesta de los tejidos periféricos a esta hormona (resistencia a la insulina) o a una combinación de ambas. Estas anormalidades conducen a alteraciones del metabolismo de hidratos de carbono, lípidos y proteínas. Sin embargo, la característica más importante del síndrome es la hiperglucemia. En condiciones normales, la insulina disminuye la glucemia al inhibir la producción de glucosa en el hígado y al estimular

la captación de glucosa y el metabolismo de la misma por el músculo y el tejido adiposo. Los diabéticos insulín dependientes poseen altos niveles de glucagón, el cual se opone a los efectos de la insulina, especialmente en el hígado, favoreciendo así la cetogénesis generando cetonemia y acidosis. La insulina aumenta la transcripción de lipoproteín lipasa del endotelio capilar y, en ausencia de la hormona, se produce hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia. Una característica importante de los diabéticos es el engrosamiento de la membrana basal capilar, este proceso progresivo que afecta los pequeños vasos sanguíneos causa perfusión inadecuada de los tejidos y genera algunas de las principales complicaciones crónicas de la Diabetes mellitus, tales como retinopatía, nefropatía y neuropatía. Alteraciones de los pequeños y grandes vasos conducen a la ulceración y gangrena en los pies (pie diabético). El factor principal de todas estas complicaciones parece residir en los altos niveles de glucosa circulante, hipótesis que fue confirmada por un estudio clínico multicéntrico (DCCT Research Group 1993). Este estudio además sugirió que es necesario un control exhaustivo de la glucemia para evitar o retardar las complicaciones antes mencionadas.

1.1.2. Incidencia e impacto socioeconómico

La incidencia de esta enfermedad varía mucho en todo el mundo, observándose la más alta en Finlandia (43:100.000 habitantes por año) disminuyendo a 1:100.000 habitantes por año en Japón. En Estados Unidos, el 10 % de la población es diabética y el 90 % de los pacientes presenta Diabetes de tipo 2. Hay componentes genéticos y ambientales que inciden en los dos tipos de diabetes más frecuentes. Un antecedente familiar de la enfermedad es predictivo de la patología, la obesidad es también un factor de alto riesgo en la diabetes de tipo 2. En Argentina la prevalencia de DM es del 5 al 7 % de la población mayor de 20 años. La DM es responsable del 15 % de los infartos agudos del miocardio (95 % ocurren en diabetes de tipo 2), 48 % de las amputaciones no traumáticas de miembros inferiores, 13 % de los pacientes en hemodiálisis y es la primera causa de ceguera no traumática en adultos. Como resultado de la aparición de estas complicaciones, la DM es también responsable de la ocupación del 8 % de las camas hospitalarias en el sector público. La tasa de uso de laboratorio, elementos diagnósticos e interconsulta de estos pacientes es de alrededor de un 60 %. Los costos generados por la atención de las complicaciones de la DM son elevados. El Ministerio de Salud de la Provincia de Buenos Aires gasta mensualmente alrededor de catorce millones de

pesos para cubrir el costo de internaciones y cuatro millones en hemodiálisis. Además, existen otros costos indirectos generados, entre otras causas, por el ausentismo y jubilaciones anticipadas (Sereday et al 1998).

La patofisiología de la Diabetes mellitus en todas sus formas es finalmente debida a la deficiencia en la señalización intracelular activada por la insulina. Por lo tanto, cualquier intento de entender la Diabetes requiere de un entendimiento del mecanismo de acción de la insulina y sus efectos en los tejidos. Además, es necesario entender los mecanismos moleculares involucrados en la transducción de señales utilizados por la insulina.

1.2. Mecanismo de acción de la insulina.

1.2.1. Receptor de insulina.

Los receptores con actividad de proteína quinasa, entre ellos el de la insulina, poseen un dominio citosólico con actividad enzimática el cual adiciona un grupo fosfato a un aminoácido de una proteína blanco, propiedad que permite clasificarlas en dos grupos, dependiendo del aminoácido que fosforilan. Si lo hacen sobre una tirosina, se los denomina receptores tirosina quinasas (**RTKs**, por *Receptor Tyrosine Kinase*) y si lo hacen sobre una serina o treonina se los denomina receptores serina / treonina quinasas (**RSTKs**, por *Receptor Serine Treonine Kinase*) respectivamente.

Los receptores con actividad tirosina quinasa son proteínas transmembrana que al activarse por un ligando se dimerizan y autofosforilan. Cabe mencionar que, en el caso de los receptores de insulina y el factor de crecimiento similar a insulina (**IGF-I**, por *Insulin-Like Growth Factor-I*) éstos ya existen como dímero. En general estos receptores son estimulados por un grupo de ligandos denominados factores de crecimiento o citoquinas y ejercen una amplia variedad de efectos, incluyendo cambios en la captación de pequeñas moléculas, iniciación y estimulación del ciclo celular y diferenciación celular, entre los más importantes.

Algunas proteínas que se unen al receptor activado poseen actividad enzimática intrínseca. Entre ellas podemos mencionar a la fosfolipasa-C- γ (**PLC- γ** , por *Phospho-Lypase-C*), la quinasa del inositol-3-fosfato (**PI3-K**, por *Phosphatidyl Inositol 3-Kinase*), proteintirosina fosfatasa-1C (**PTP1C**, por *Protein Tyrosine Phosphatase 1C*) y a la familia de las proteína

tirosina quinasas citosólicas denominadas **Src** (proteínas relacionadas con el oncogén derivado del Virus de Sarcoma de Rous).

Los receptores que poseen actividad tirosina quinasa intrínseca como el receptor de insulina IR (**IR**, por *Insulin Receptor*) se autofosforilan en restos de tirosina en respuesta a la unión de la hormona y se asocian con proteínas adaptadoras como IRS1/2 (**IRS-1/2**, por *Insulin Receptor Substrate 1 y 2*), Grb2 (**Grb2**, por *Growth Factor receptor-bound protein 2*) y Shc (**Shc**, por *SH2 domain-containing protein*) (Diagrama 1). Estos sustratos son comunmente denominados proteínas *docking*, dado que diferentes proteínas intracelulares se unen a sus regiones fosforiladas en tirosina y transmiten la señal. El IRS luego activa a diferentes quinasas, como la PI3-K.

La función de las proteínas adaptadoras es mantener unidos a grandes complejos multiproteicos que participan en vías de transducción de señales. No tienen actividad catalítica ni activan a proteínas efectoras en forma directa. Contienen distintos dominios en sus secuencias que actúan como sitios de acoplamiento para otras proteínas. Por ejemplo: dominios SH2 (**SH2**, por *Src Homolgy type 2 domain*) y PTB (**PTB**, por *Phospho-Tyrosine-Binding domains*) se unen a residuos de fosfotirosina, dominios SH3 (**SH3**, por *Src Homolgy type 3 domain*) y WW que unen secuencias ricas en prolina, dominios PH (**PH**, por *Plekstrin Homology*) que reconocen fosfatidilinositoles-3-fosfato y dominios PDZ que unen secuencias carboxilo terminal con un resto hidrófobo. El IRS-1 posee dominios del tipo PH y PTB que pueden interaccionar con el IR, además, contiene restos de tirosina que son fosforilados y que a su vez interaccionan con dominios SH2 de proteínas como PI3-K.

Las proteínas adaptadoras interaccionan con otras proteínas de transducción de señales tales como proteínas G monoméricas. Una clase principal de proteínas G, denominadas proteínas G pequeñas, es la familia Ras, que fueron inicialmente aisladas de sarcomas murinos inducidos por virus (**Ras**, por *Retrovirus associated sequences*). Homólogos celulares normales de oncogenes son a menudo referidos como proto-oncogenes. La familia de proteínas Ras o similares a Ras se activa en respuesta a la fosforilación del RTK (Diagrama 1). A diferencia de las proteínas G α , Ras no se acopla al RTK. La activación de Ras depende de un factor de intercambio de nucleótidos de guanina (**GEF**, por *Guanine-nucleotide Exchange Factor*). Las proteínas adaptadoras como Grb2 y Shc activan a proteínas GEF. La proteína Grb2 posee dominios SH2 a través de los cuales se une a RTK fosforilados o a proteínas adaptadoras como Shc o IRS. Además, posee dominios SH3 que son reconocidos por proteínas GEF, tales como Sos (**Sos**, por *Son of sevenless*). El extremo carboxilo terminal de Sos inhibe su

actividad GEF y la fijación a Grb2 elimina esta inhibición. La desactivación de Ras se produce a través de su actividad de GTPasa o por proteínas que aceleran en unas 100 veces su actividad GTPasa, denominadas GAP (**GAP**, por *GTPase-Activating Protein*) (Burgering y Bos, 1995). La activación de Ras desencadena la cascada de fosforilaciones de la vía de las quinasas activadas por mitógenos (**MAPKs**, por *Mitogen Activated Protein Kinases*).

La acción de la insulina depende en primera instancia de su unión al receptor y la consecuente activación del mismo y sus sustratos. Luego la señal es transducida e involucra una serie de quinasas de proteínas como las MAPK y las S6 quinasas, así como también quinasas de lípidos como la PI3-K.

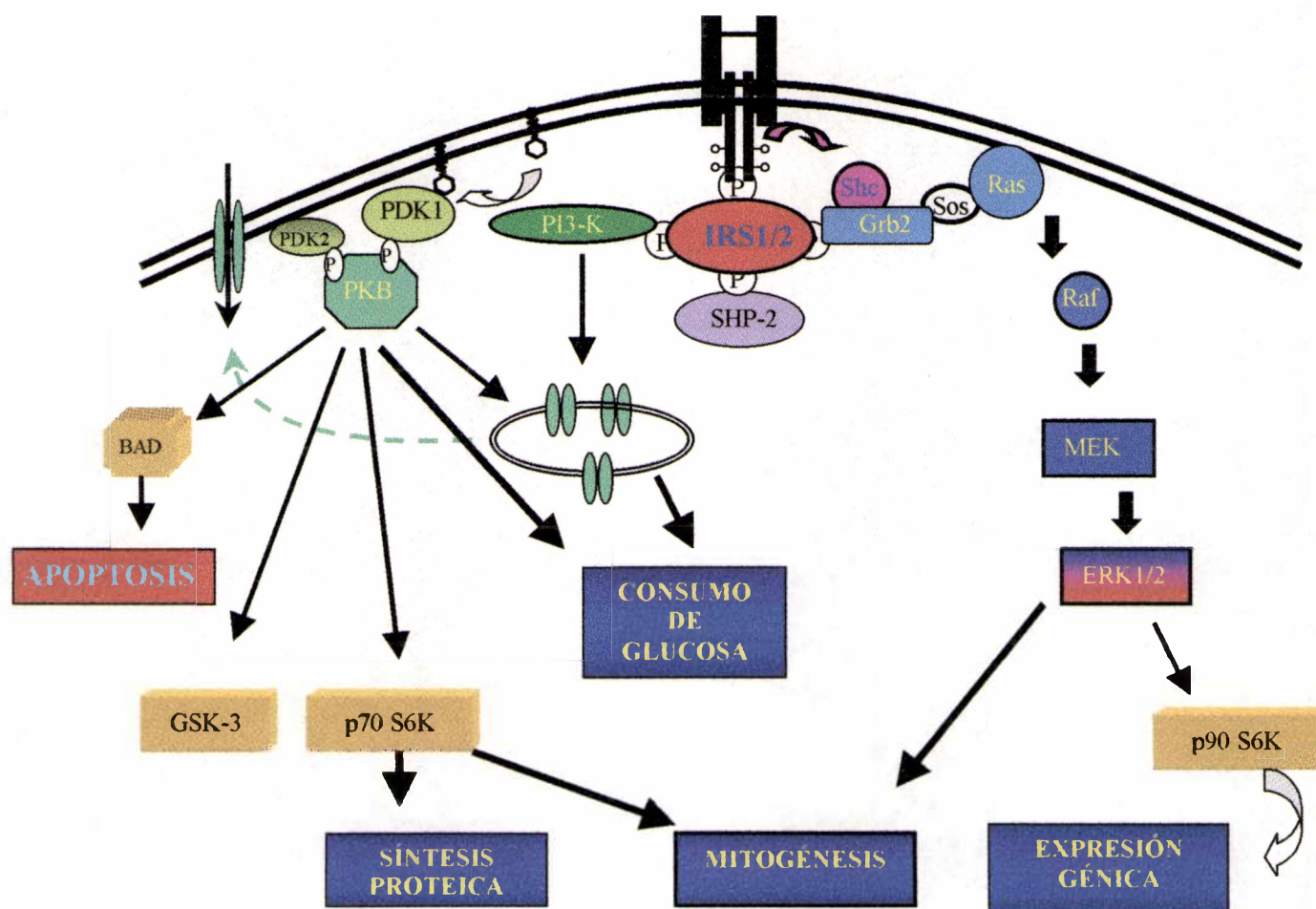


Diagrama 1: Diagrama de la casacada de la insulina con sus dos principales vías.

1.2.2. Cascada de las MAPKs.

1.2.2.1. Generalidades.

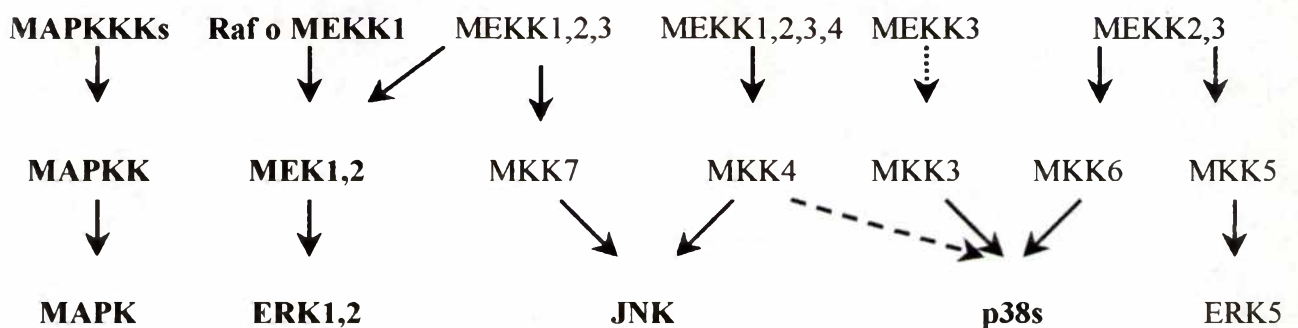
En la década de 1980, las MAPK fueron detectadas como proteínas fosforiladas en restos de tirosina en células estimuladas con mitógenos (Rossomando et al 1989). La cascada de las MAPKs es altamente conservada desde las levaduras hasta los vertebrados y estas enzimas están involucradas en la regulación de una amplia variedad de procesos celulares, tales como: proliferación, diferenciación, ciclo celular, supervivencia y apoptosis (Robinson y Cobb 1997; Chang y Karin 2001).

La cascada de las MAPKs consiste en tres familias de quinasas denominadas: quinasas reguladas extracelularmente (**ERKs**, por *Extracellular Regulated Kinases*) (Diagrama 1) quinasas que fosforilan el dominio amino terminal del factor de transcripción c-jun o quinasas activadas por estrés (**JNKs, SAPKs** o **JNKs / SAPK**, por *c-Jun N-terminal Kinases / Stress-Activated Protein Kinases*) y las quinasas p38 (**p38s**, en alusión a su peso molecular). Cada cascada consta al menos de tres quinasas que son activadas consecutivamente, comenzando por una proteína quinasa-quinasa-quinasa activada por mitógenos (**MAPKKK**, por *MAPK Kinase Kinase*) que fosforila y activa a una MAPKKinasa, que a su vez fosforila y activa a las MAPKs. Hasta el momento se han identificado 14 MAPKKK, 7 MAPKK y 12 MAPK en células de mamíferos (Enslen y Davis 2001). Una vez que las MAPKs son activadas, fosforilan diferentes proteínas y factores de transcripción los cuales desencadenan diferentes procesos celulares (Zhou et al 1995; Han et al 1996; Blank et al 1996; Waskiewicz et al 1997; Foltz et al 1998).

Las MAPKKinasas, también denominadas MEK (**MEKs**, del acronismo *MAP / ERK Kinases*) son activadas por MAPKKKs, también denominadas MEKKs (**MEKKs**, por *MEK Kinase*). Los miembros de la familia MEKK muestran diferente localización subcelular y contienen distintos dominios amino terminales. Son reguladas por diferentes estímulos extracelulares y mecanismos intracelulares, por lo tanto, estarían involucradas en diferentes funciones (Hagemann y Blank 2001). La mejor estudiada de la familia MEKK es la denominada isoforma Raf-1 (**Raf-1**, por *Ras activated factor-1*). Su regulación involucra la interacción entre proteínas; fosforilación en restos de tirosina, treonina y serina; además de la localización subcelular (Hagemann y Rapp 1999). La fosforilación de Raf-1 está influenciada

por diferentes proteínas quinasas, incluyendo Src, miembros de la familia de la proteína quinasa C (**PKC**, por *Calcium-dependent Protein Kinase*), la proteína quinasa p21 (**PAK**, por *Protein Activated Kinase*) y la proteína quinasa B (**PKB / Akt**, por *Protein Kinase B*) (Burgering y Bos 1995). La familia de proteínas Raf, quinasas citosólicas de serina y treonina, está compuesta por A-Raf, B-Raf y Raf-1 o c-Raf (Abdel-Hafiz et al 1992; Dent et al 1992; Force et al 1994; Morrison y Cutler 1997; Hagemann y Rapp 1999).

La activación de Raf estaría asociada a la interacción de sus dominios regulatorios con diferentes activadores. Estos dominios parecen estar involucrados en la unión a proteínas G. La mejor estudiada es la activación de Raf por la proteína intercambiadora de nucleótidos de guanina, Ras. Las proteínas 14.3.3 son pequeñas proteínas adaptadoras que estabilizan a Raf-1 (Jones et al 1995; Fu et al 2000). Raf-1 debe estar fosforilada en las serinas 259 y 621 para asociarse con la proteína 14.3.3 (Michaud et al 1995). En la membrana plasmática, el complejo 14.3.3 - Raf-1 interactúa con Ras unido a GTP, luego se libera la proteína 14.3.3 permitiendo la activación de Raf-1 por una fosfatasa específica. Las serina / treonina fosfatasas 1 y 2A (**PP1** y **PP2A**, por *Protein Phosphatase-1 y -2A*) tienen un papel positivo en la activación de Raf, ya que la inhibición de PP1 y PP2A causa la acumulación del complejo Raf-1 / 14.3.3 en la membrana, el cual no puede ser activado (Jaumot y Hancock 2001). Por otro lado, la asociación 14.3.3 - Raf-1 permitiría la activación de Raf-1 por quinasas, las cuales podrían pertenecer a la familia de la PKC (Kolch et al 1993; Van Der Hoeven et al 2000a; Van Der Hoeven et al 2000b). También se ha observado la activación directa de Raf por la proteína 14.3.3 (Fantl et al 1994; Freed et al 1994).



1.2.2.2. Regulación de MAPKs

Las MAPK son reguladas por cascadas de fosforilaciones e interacciones del tipo proteína - proteína. Las quinasas que fosforilan y activan a las MAPKs, MEKs, poseen especificidad dual fosforilándolas en restos de serina / treonina y también en restos de tirosina (Seger et al 1992; Crews et al 1992; Kosako et al 1992).

Hay características de las MAPKs que resultan de su activación por una cascada de quinasas. La cascada posee diferentes puntos de comunicación con otras vías y esto le permite aumentar o suprimir la señal que activa a las MAPKs (Frost et al 1997; Schonwasser et al 1998; Corbit et al 1999). Otro aspecto importante es la amplificación de la señal inicial. En el caso de la vía de las ERKs, la amplificación ocurre en el escalón Raf-MEK, ya que MEK1 es mucho más abundante que Raf (Stevenson et al 1992; Huang y Ferrell 1996). Por último, en la vía de las MAPKs, las ERKs deben ser fosforiladas en tirosina antes que en treonina para que se activen totalmente. Si se fosforila solo el resto de tirosina se activa unas 4 veces, mientras que si es fosforilada en ambos aminoácidos, tirosina y treonina, se activa 1000 veces. Para que las ERKs sean fosforiladas en treonina es necesario que previamente se produzca la fosforilación de restos de tirosina. El resultado de esta fosforilación dual es la generación de un umbral de activación, similar al de los segundos mensajeros (Ferrell y Bhatt 1997; Ferrell 1999). Las MEKs son activadas por la fosforilación de dos residuos de serina o treonina, sin embargo esto no constituiría un umbral de activación como en el caso de las anteriores. En general, las MEKs, son más abundantes que sus quinasas, constituyendo de esta forma un escalón de amplificación de la señal.

Las proteínas *scaffold* son un grupo de proteínas que forman complejos multiproteicos actuando como andamios de las diferentes enzimas que participan de una determinada señal intracelular. Contribuyen a la especificidad, organización y localización de diferentes vías de señalización.

En el caso de los mamíferos ya fueron descritas y propuestas algunas proteínas que actuarían como *scaffold*: las proteínas MP-1 (**MP-1**, por *MEK Partner 1*), Grb10 y KSR (**KSR**, por *Kinase Suppressor of Ras*). Estas proteínas tendrían algunas funciones importantes como organizar las cascadas de las MAPKs para una eficiente serie de activaciones, restringir la señal en respuesta a diferentes activadores o receptores, determinar la especificidad de la transmisión de la señal por interactuar con un limitado número de componentes y por último,

direccionar el efecto final de la señal, no solamente por la selectividad, sino también por la localización de la cascada en el sitio de acción (Pearson et al 2001).

1.2.2.3. Cascada de las ERKs y sus mecanismos regulatorios.

Las ERK1/2 son proteínas de 42 y 44 kDa similares en más de un 85 % y la región que involucra la interacción con ligandos es más similar aún (Boulton et al 1990; Boulton et al 1991). En ambas, los dos residuos que pueden ser fosforilados por diferentes quinasas, treonina y tirosina, están separados por un residuo de glutamato (Payne et al 1991). ERK1/2 se expresan ubicuamente, pero su expresión relativa en los diferentes tejidos es variable. En células inmunológicas, ERK2 es la especie predominante, mientras que en células de origen neuroendócrino ambas ERKs serían similarmente expresadas. El grado de activación de las ERKs depende del ligando, del tejido y del contexto celular (Lewis et al 1998). La cascada de transducción de señales de las ERKs es activada por diferentes receptores de membrana. Gran parte de ellos poseen actividad tirosina quinasa. Su activación está implicada en una amplia variedad de funciones celulares, tan diversas como proliferación, diferenciación y supervivencia celular (Pearson et al 2001).

La **activación de las ERKs** se produce por ligandos que se unen a receptores con actividad tirosina quinasa o asociados a proteínas G y por agentes que actúan en diferentes puntos o escalones de las cascadas activadas por estos receptores (Hunter 1995; Pawson y Scott 1997; Cobb 1999) (Diagrama 1). La vía de las ERKs se inicia por las proteínas adaptadoras Grb2 y Shc que poseen un dominio SH2 con el que interaccionan con los residuos de fosfotirosina del receptor de factores de crecimiento, la insulina y otras proteínas como los IRSs.

La proteína Grb2 posee dos dominios SH3 con los que interacciona con factores intercambiadores de nucleótidos de guanina como Sos. Así, tras la formación del complejo Grb2/Sos, éste se dirige a la membrana plasmática estimulando el intercambio de nucleótidos en Ras, transformando Ras-GDP (forma inactiva) en Ras-GTP (forma activa) (Lowenstein et al 1992). Ras activo es capaz de interaccionar y activar a las serina /treonina quinasas Raf-1, A-Raf y B-Raf (Wood et al 1992). Estas últimas a su vez fosforilan a las tirosina / treonina quinasas duales MEK1/2 y éstas finalmente fosforilan a las serina / treonina quinasas ERK1/2. La localización de Raf en la membrana plasmática podría permitirle a otras quinasas como PKC, PI3-K y PAK incrementar su actividad (Grammer y Blenis 1997). Las ERKs son

activadas a través de fosforilación dual por la quinasa MEK activa. Este tipo de activación es común a todas las isoformas de MAPKs conocidas (Cobb 1999; Lev et al 1995).

Los ésteres de forbol como el 12-miristato-13-acetato de forbol (**PMA**, por *Phorbol Miristate Acetate*) son capaces de activar las ERKs a través de la PKC. En algunos sistemas, Ras es activada por la PKC, mientras que en otros, mecanismos independientes de Ras podrían interaccionar directamente con Raf para activar a las ERKs (Cobb 1999).

Una vez que las ERK1/2 son activadas, éstas pueden fosforilar a diferentes proteínas dianas localizadas en la membrana plasmática y en el citoplasma, dando lugar a la activación de otras vías de señalización o dirigirse al núcleo y fosforilar diversos factores de transcripción como son, entre otros, c-Myc, c-Jun, c-Fos, Elk-1 y p62TCF, produciendo así la activación o la represión transcripcional de determinados genes (Davis 1993). La activación de la vía Ras/MAPK parece ser imprescindible para la proliferación celular mediada por factores de crecimiento (**GF**, por *Growth Factor*), pero no parece ser esencial para la supervivencia celular ya que este proceso está mediado por vías independientes de Ras (Walker et al 1998).

La **regulación de las ERKs** puede efectuarse por diferentes mecanismos entre los cuales están los receptores asociados a proteínas G, PKC, la localización celular y la duración de su activación.

Los receptores asociados a proteínas G modulan la actividad de diferentes adenilatoquinas además de otras quinasas como la PKC. La adenilato ciclasa produce adenosina-3', 5'-momofosfato cíclico (**AMPc**) a partir de GTP. El AMPc activa directamente a la proteína quinasa A (**PKA**, por *AMPc-dependent Protein Kinase*). La PKA es una serina / treonina quinasa que fosforila a diferentes enzimas como la glucógeno sintasa, piruvato quinasa, histonas H1 y H2B y la proteína CREB (CREB, por *AMPc Response Element Binding Protein*). La PKA estaría involucrada en la fosforilación de Raf-1. Así, se demostró que fosforila *in vitro* e *in vivo* a Raf-1, disminuyendo su afinidad por Ras-GTP (Burgering y Bos 1995). La activación de proteínas G promueve la producción de AMPc, el cual puede no tener efecto, inhibir fuertemente o estimular la actividad de las ERKs, dependiendo del tipo celular o del receptor estimulado. Por ejemplo, el AMPc en fibroblastos suprime la activación de las ERK mediada por GFs, mientras que en células PC12 el AMPc estimula la activación de las ERKs (Wu et al 1993; Cook y McCormick 1993; Frodin et al 1994). En células epiteliales CCL39 la prostaglandina-E1 aumenta el AMPc e inhibe la proliferación sin afectar la activación de la ERK1 por GF (Kahn et al 1992; McKenzie y Pouyssegur 1996), sugiriendo

que el AMPc puede inhibir la proliferación independientemente de las ERKs. El AMPc o análogos y activadores de la producción del mismo inhiben la activación de las ERKs inducida por la insulina, los GFs y el PMA (Burgering y Bos 1995). Sin embargo, en células Swiss 3T3 y PC12, el aumento de AMPc produjo una débil activación de las ERKs, independientemente de Ras (Frodin et al 1994). El aumento en el AMPc no tuvo efecto sobre la autofosforilación del RTK, la habilidad del receptor para asociarse a moléculas de señalización (PI3-K o Shc) o la habilidad de Ras para unir GTP.

La proteína quinasa C es activada en presencia de diacilglicerol (DAC) y calcio; además es activada por ésteres de forbol. Hay al menos diez proteínas de la familia de la PKC. Cada una de estas enzimas se expresa de diferente forma en los tejidos. Además, los diferentes tipos de PKC responden de forma desigual al calcio y al DAG, pero no así al PMA. La PKC fosforila a diferentes proteínas activando o inhibiendo su actividad. Por ejemplo, fosforila el receptor para EGF disminuyendo su actividad tirosina quinasa, mientras que, activa a las ERKs a través de la fosforilación de Raf-1.

La activación de las ERKs por el PMA es independiente de Ras y, sin embargo, es inhibida por el AMPc (Burgering et al 1993). Rap1a es una proteína con actividad GTPasa similar a Ras y podría estar implicada en la inhibición mediada por PKA, explicando estas diferencias (Burgering y Bos 1995). PMA estimula la fosforilación de las ERKs a través de la activación de PKC, que activa a Raf-1 independientemente de Ras (de Vries-Smits et al 1992; Schaap et al 1993). Estos datos sugieren que tanto la proteína Ras como la PKC activarían la vía Raf-1 / ERK, además sería necesaria la presencia de ambas para una activación más eficiente de la proteína Raf-1 (Burgering y Bos 1995).

La localización espacial de las quinasas y los sustratos determinan cual señal podría ser transmitida y recibida por diferentes sitios de acción. Muchos estudios se han realizado para tratar de entender la localización de las ERK1/2 en el núcleo. Estímulos que inducen la localización nuclear de las ERKs parecen esenciales para la transformación de fibroblastos y la diferenciación de las células PC12 (Cowley et al 1994; Robinson et al 1998). Algunos de los efectos que involucran a las ERKs en la regulación de la transcripción de genes, necesitan una localización nuclear de estas quinasas. La translocación nuclear podría ocurrir por diferentes mecanismos, tales como: ingreso por difusión al núcleo, dimerización, transporte activo de monómeros, dímeros o complejos de proteína, exportación nuclear de ERKs y sitios de retención nuclear (Fukuda et al 1997; Lenormand et al 1998; Khokhlatchev et al 1998; Adachi et al 1999; Adachi et al 2000). El mecanismo de control por localización subcelular

involucra a complejos MEK-ERK y dimerización de las MAPK. La localización subcelular está fuertemente influenciada por la fosforilación y la subsecuente dimerización, independientemente de la actividad quinasas. Mutantes de ERK2, que no pueden dimerizarse, se acumulan en menor cantidad en el núcleo, sugiriendo que la dimerización es importante para su localización subcelular (Khokhlatchev et al 1998).

En las células neuronales PC12, las MAPKs median la proliferación y diferenciación celular. Tanto el factor de crecimiento derivado del endotelio (EGF, por *Endothelium-derived Growth Factor*) como el derivado del nervio (NGF, por *Nerve-derived Growth Factor*) activan a Ras; sin embargo, el primero estimula la proliferación y el segundo la diferenciación. Además, se observó que la mutación de MEK constitutivamente activo, produce la diferenciación de las células PC12. La diferencia podría explicarse en la duración de la activación, siendo sostenida para NGF y transitoria para EGF (Cowley et al 1994). Una razón para explicar esto sería que el receptor de EGF es más susceptible a una regulación negativa que el receptor de NGF. Hay diferentes propuestas de cómo la duración de la señal podría determinar la respuesta; una de ellas propone que la duración de la señal determinaría la expresión de componentes de la vía y en algunos puntos podría superarse un umbral de activación; otra posibilidad es que la activación prolongada determine la translocación de las MAPKs al núcleo.

Un mecanismo fundamental que la célula utiliza para controlar sus procesos biológicos es a través de la fosforilación de proteínas y su desfosforilación. *In vivo*, el contenido de proteínas fosforiladas es un equilibrio dinámico entre la actividad de las quinasas y las fosfatasas, mostrando que ambas tienen un papel preponderante en la regulación de procesos celulares. La duración y la amplitud de la activación de las MAPKs representan el balance entre la señal de activación y el mecanismo de inactivación.

Las fosfatasas de proteínas fosforiladas en tirosina (PTPasas, por *Protein Tyrosine Phosphatase*) pueden funcionar activando o inhibiendo diferentes señales. Por ejemplo, la fosfatasa cdc25 desfosforila a la proteína cdc2 y activa el complejo cdc2 / ciclina B, promoviendo así la mitogénesis (Millar y Russell 1992); por último, las fosfatasas de las MAPKs (MKPs, por *MAPK-related Phosphatases*) desactivan señales mitogénicas por desfosforilación de las ERKs (Sun et al 1993; Keyse 1995a; Keyse 1995b; Chu et al 1996; Keyse 2000).

Debido a que ambos residuos de treonina y tirosina deben estar fosforilados para obtener una actividad máxima de ERKs, la remoción de uno de estos fosfatos inactiva significativamente a

la quinasa. Diferentes MKPs producen la inactivación de las MAPKs en un tiempo y lugar apropiado (Zheng y Guan 1993a; Zheng y Guan 1993b; Keyse 2000; Camps et al 2000; Thimmaiah et al 2003). Por lo tanto, la desactivación específica de las MAPKs depende de la especificidad y localización de las fosfatasas. Las MKPs son un grupo de fosfatasas específicas y duales relacionadas con el gen de la familia de las tirosina fosfatasas. Las diferencias en la localización y la inducción implican diferencias en la inactivación temporal y espacial que ellas podrían producir.

MKP-1, entre otras fosfatasas, está localizada en el núcleo. Bloqueando la expresión de MKP-1 se prolonga en el tiempo la actividad de ERK, sugiriendo que MKP-1 inactiva a las MAPK en el núcleo (Sun et al 1993; Groom et al 1996). El suero y los GFs inducen la expresión de ciertas MKPs, las cuales, en algunos casos, contienen un promotor sensible a ERK, indicando que la inducción de MKPs podría ser un mecanismo de retroalimentación negativo, limitando el tiempo de activación de las ERKs. Otra fosfatasa involucrada en la inactivación de las ERKs sería la PP-2A que se expresa constitutivamente. Se sugiere que las fosfatasas constitutivas, como la PP-2A, tendrían un papel preponderante en la finalización de la fase temprana de una respuesta mediada por las ERKs (Alessi et al 1995).

Finalmente, la inactivación de MAPK puede ocurrir a través de múltiples fosfatasas. Estas fosfatasas podrían actuar de diferentes maneras: dependiente del estímulo, ser temporalmente reguladas o controlar la actividad sólo de una subpoblación de MAPKs debido a su compartimentalización o colocación (Keyse 1995b).

1.2.2.3.1. Consecuencias biológicas de la activación de la vía de las ERKs.

Diferentes sustratos de las ERKs. Las ERKs fosforilan diferentes proteínas, tales como quinasas, factores de transcripción, proteínas regulatorias y estructurales (Reszka et al 1995; Widmann et al 1999; Gibson et al 1999). Entre las proteínas quinasas mejor descritas hasta el momento están las quinasas ribosomales Rsk1, Rsk2, Rsk3 (**Rsk**, por *Ribosomal S6 Kinase*) y las quinasas que interactúan con MAPK (**Mnk 1 y 2**, por *MAPKinase-interacting Kinase*). Rsk1 y Rsk2 fueron inicialmente identificadas como p90 quinasa ribosomal S6 (**p90S6K**) o también denominadas MAPKAPK 1 α y β (Sturgill et al 1988). Las ERKs fosforilan a las proteínas Rsks en la serina 363 y la treonina 573. Una vez activadas, Rsk 1, 2 y 3 son capaces de fosforilar a proteínas relacionadas con la activación transcripcional como

la proteína de unión al elemento de respuesta al AMPc (CREB), el complejo coactivador CBP (CBP, por *CREB Binding Proteins*), el factor de respuesta al suero (SRF, por *Serum Response Factor*) y el receptor de estrógenos (Pearson et al 2001). Además, fosforilan la quinasa de la glucógeno sintasa-3 (GSK-3, por *Glycogen Synthase Kinase-3*), que participa en la regulación negativa de la transcripción, la muerte celular programada y la síntesis de glucógeno. Por otro lado, Rsk puede fosforilar al factor intercambiador de GDP/GTP de Ras (Sos), modulando negativamente la vía Ras / ERK (Eldar-Finkelman et al 1995; Frodin y Gammeltoft 1999). Por último, las ERKs a través de Rsk fosforilan y activan a la fosfatasa PP-1 que desfosforila y activa a la glucógeno sintasa (Dent et al 1990; Davis 1993).

La vía de las ERKs regula a diferentes factores de transcripción como c-fos y c-jun y heterodímeros formados por ellos como la proteína activadora AP-1 (AP-1, por *Activator Protein-1*) la cual se une a un sitio del ADN denominado *AP-1-binding site* (Chen et al 1996; Xing et al 1998). Los factores de transcripción (FT) son otro grupo de sustratos para las ERKs. AP-1 es un factor de transcripción compuesto por dos proteínas: Jun, Fos o ATF2 (ATF2, por *Activating Transcription Factor-2*). Los factores que activan a AP-1 regulan diferentes genes denominados tempranos. El factor de transcripción AP-1 está involucrado en diferentes efectos celulares, tales como proliferación, supervivencia y muerte celular. La proteína Fos está relacionada con la inducción de la proliferación y la diferenciación. En el caso particular del factor de transcripción Elk-1 o también denominado p62TCF es necesario que las ERKs ingresen al núcleo para activarlo (Brunet et al 1999). Este FT se une a promotores de varios genes y regula su expresión en respuesta a la activación de las MAPKs (Davis 1993).

Efecto de las ERKs sobre la proliferación. Las ERKs son activadas por mitógenos y una característica común es que son parte esencial de las señales mitogénicas. Las células en cultivo responden a distintos estímulos mitogénicos ingresando en el ciclo celular que finaliza con la división de la célula. La regulación del crecimiento y la proliferación celular es un proceso muy complejo. El ciclo celular consta de diferentes etapas entre las cuales podemos distinguir las fases G0, G1, S, G2 y M. La fase G0 es un estado en el cual la célula está quiescente. La fase G1 del ciclo celular comprende el acondicionamiento y síntesis de proteínas para la próxima etapa denominada S, en la cual se produce la síntesis de ADN. En la fase G2 nuevamente tiene lugar gran síntesis de proteínas debido a que la célula se prepara para la división. Por último, la fase M es la etapa de división celular donde a partir de una célula con doble carga genética se generan dos células por un proceso denominado mitosis.

Existen puntos de transición y control que regulan el ciclo celular. La transición de la fase G0 a G1 es la iniciación del ciclo y está regulada por factores de crecimiento, por la insulina y por condiciones del medio. Los dos puntos de control del ciclo celular más importantes se encuentran en la fase G1 y en la transición de fases G2-M.

Las señales dependientes de factores de crecimiento controlan diferentes complejos de ciclinas mediante quinasas dependientes de ciclinas (**CDKs**, por *Ciclin Dependent Kinases*) a través de la activación de la vía Ras y de las MAPKs. Diferentes complejos de ciclinas - CDKs controlan el ciclo celular. Los factores de crecimiento regulan la fase G1 temprana a través del complejo ciclina D - CDK4/6. Posteriormente, la entrada y progresión a través de la fase S están reguladas por los complejos ciclina E - y ciclina A - CDK2. Por último, la transición de la fase G2 / M está regulada por el complejo ciclina B - CDK1/2. La actividad de las CDKs es suprimida por numerosos inhibidores de CDK (**CDKIs**, por *Ciclin Dependent Kinases Inhibitors*) de los cuales hay dos familias: la Ink4 y la p21.

La vía Ras es activada por estímulos extracelulares que inducen a la célula a salir de la fase G0 mediante la activación de factores de transcripción multigénicos nucleares como **Elk-1** y **c-myc**. Luego, en la fase G1, esta vía regula la expresión de la ciclina D, la cual se une a la quinasa dependiente de ciclinas y promueven así la fosforilación de la proteína antioncogénica **pRB (RB)**, por no encontrarse en un **Retinoblastoma**; ésta controla la función de una familia de reguladores transcripcionales llamados **E2Fs** y la entrada en la fase S. La estimulación de la progresión del ciclo celular ocurre a través de la activación del factor de transcripción E2F, que directamente regula la transcripción de genes para la proliferación celular y la síntesis de ADN. La expresión de la ciclina D y el supresor de tumores pRB estaría regulada por las ERKs y por otro lado la PKB estabilizaría a la ciclina D, estando involucrada la GSK-3 (Downward, 1998). Las ERKs modularían la entrada de la célula en la fase S por tres vías. Primero, por la iniciación de la síntesis de ciclinas A y E como resultado de la fosforilación del supresor de tumores pRB por el complejo ciclina D1 - CDK4/6 y la liberación del factor de transcripción E2F. Segundo, por la degradación de CDKIs favoreciendo la formación de los complejos ciclina A- y ciclina E-CDK2. Tercero, por la liberación de complejos CDK2 activos (Wilkinson y Millar 2000).

Mansour y colaboradores estudiaron extensamente la vía de las ERKs (Mansour et al 1994) y mostraron que la expresión de las MEK1/2, constitutivamente activas, causó la transformación de fibroblastos y la producción de tumores en ratones *nude*. Una proteína de fusión ERK-2 / MEK1, expresada en el núcleo, es suficiente para transformar los fibroblastos,

sugiriendo que la actividad de ERK2 es suficiente para convertir células normales en inmortales (Robinson et al 1998).

Efecto de las ERKs sobre la diferenciación neuronal. Las células PC12 se diferencian y caracterizan por la producción de marcadores neuronales como canales de sodio y la extensión de neuritas en respuesta a NGF, FGF y otros agentes. El crecimiento de neuritas fue correlacionado con la activación prolongada de las ERKs. Los agentes que causan una activación transitoria de las ERKs, tales como EGF, no producen el crecimiento de neuritas. La inhibición de las ERKs bloquea la producción de neuritas inducidas por NGF, indicando que las ERKs participan en dicho efecto (Cowley et al 1994; Marshall 1995; Kamata et al 1996). La microinyección de ERKs fosforiladas o la expresión de proteínas de fusión ERK2-MEK1 produce la prolongación de neuritas (Fukuda et al 1995; Robinson et al 1998). Estos hallazgos indican que la actividad de las ERKs está relacionada con la diferenciación morfológica de las células PC12. Por otro lado, en cultivos neuronales primarios, las ERKs no son requeridas para la producción de neuritas, sugiriendo que el requerimiento variaría aún dentro de diferentes tipos de células neuronales (Virdee y Tolkovsky 1996; Gunn-Moore et al 1997).

Efectos de las ERKs en la supervivencia celular. Además de sus efectos sobre el crecimiento, la proliferación y la diferenciación, las ERKs contribuyen a la supervivencia celular. No solo activan vías relacionadas con el crecimiento y la proliferación celular, sino que además fosforilan e inhiben diferentes proteínas relacionadas con la apoptosis.

Se propone que la generación de especies de oxígeno reactivas (ROS, por *Reactive Oxygen Species*) participa en la propagación de señales de diferentes GF, hormonas y citoquinas como Angiotensina II, PDGF, EGF e insulina entre otras (Griendling et al 1994; Sundaresan et al 1995; Bae et al 1997; Mahadev et al 2001). Sin embargo, un aumento excesivo de las ROS podría activar diferentes vías de transducción de señales produciendo alteraciones, daño en el ADN y apoptosis celular. El estrés oxidativo es causado por una excesiva acumulación de especies de oxígeno y nitrógeno reactivas como resultado de un déficit en las defensas antioxidantes de la célula o a la superación de las mismas por una excesiva producción de radicales derivados del oxígeno y del nitrógeno. Las vías de las MAPKs y la PI3-K / PKB son activadas por las ROS y así mediarían los efectos sobre la proliferación, supervivencia y muerte celular (Guyton et al 1996; Liu et al 1996; Erhardt et al 1999; Blalock et al 2003; Jin et al 2003). En diferentes experimentos se ha observado que las ROS activan a las tres familias de las MAPKs y a la vía de la PI3-K; sin embargo, la duración e intensidad es

diferente en cada una de ellas. Se propone que las ROS activarían estas vías a través de la inhibición de las PTPasas. La oxidación en un residuo de cisteína en el sitio activo de la PTPasa sería responsable del efecto inhibitorio (Zhang 1998).

Un mecanismo por el cual las ERKs contribuyen a la supervivencia celular es mediante la inhibición de alguno de los procesos apoptóticos. Tanto las ERKs como las Rsk fosforilan a la proteína BAD e inhiben su efecto proapoptótico (Scheid et al 1999). Las Rsk fosforilan el factor de transcripción CREB en la serina 133, promoviendo la supervivencia celular ya que la inhibición de la fosforilación en la serina 133 de CREB desencadena apoptosis. La vía Ras / ERKs fosforila la caspasa 9 en la treonina 125 inhibiendo su actividad y aportando a la inhibición de la apoptosis (Allan et al 2003).

Otro componente de la vía de las MAPKs, Raf-1, también promueve la supervivencia celular, independientemente de la vía MEK / ERKs. Raf-1 interaccionaría directamente con quinasas que regulan la apoptosis tales como (ASK-1) (Chen et al 2001).

1.2.3. Cascada de la PI3-K.

La quinasa de fosfoinosítidos PI3-K es un elemento fundamental en la transducción de señales metabólicas de la insulina, además, ha sido considerada como un oncogen debido a que participa en la regulación de la proliferación, diferenciación y supervivencia celular (Kahn 1997; Neri et al 2002).

Existen diferentes isoformas de la PI3-K en células de mamíferos que se subdividen en tres clases denominadas I, II, y III. La más estudiada es la clase I dado que está relacionada con estímulos extracelulares. La clase IA consiste en una subunidad catalítica de 110 kDa (**p110**) y otra subunidad adaptadora o regulatoria. Además, posee un dominio de unión a Ras que no poseen las clases II y III. Se han descrito al menos siete proteínas adaptadoras que se generan por *splicing* alternativos de tres genes diferentes (**p85 α** , **p85 β** y **p55 γ**). Todas las subunidades regulatorias se unen al IRS en respuesta a la insulina. La subunidad p85 α se expresa ubicuamente en todos los tejidos, mientras que las otras subunidades regulatorias lo hacen diferencialmente. Así, cada subunidad regulatoria podría tener una función específica dependiendo de su afinidad por el IRS (Shepherd et al 1998).

1.2.3.1. Activación de la PI3-K.

La PI3-K es activada principalmente en respuesta a factores de crecimiento y a la insulina. El mejor mecanismo de activación de la PI3-K es su interacción con los IRSs y en menor medida por la interacción directa con receptores fosforilados en restos de tirosina. La capacidad de la insulina para activar la PI3-K es inhibida por ésteres de forbol, glucagón y ácido okadaico, los cuales actuarían a través de la fosforilación del IRS en restos de serina y treonina. Otro mecanismo involucrado en la regulación de PI3-K es vía Ras, el cual interacciona directamente con la subunidad regulatoria. Esta unión podría estar jugando un papel importante en la localización de PI3-K en la membrana plasmática, dado que Ras es una proteína anclada en la membrana. Además, se sugiere que esta interacción podría activar también a Ras (Shepherd et al 1998).

1.2.3.2. Mecanismo de transducción de señales disparado por la PI3-K.

La estimulación de la actividad catalítica de la quinasa de fosfoinosítidos produce fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (**PIP₃**) al fosforilar al fosfatidilinositol-4,5-difosfato (**PIP₂**) de la membrana plasmática celular. El incremento de PIP₃ desencadena una serie de respuestas biológicas al estimular diferentes moléculas de señalización (Diagrama 1), tales como PKB, GSK-3, p70S6K y las fosfatasas PP1 y PP2A (Shepherd et al 1998; Downward 1998).

Proteína quinasa B (Akt / PKB). Akt fue inicialmente identificada como el homólogo en mamíferos del oncogen viral v-akt. Fue denominada luego PKB dado que ya existían PKA y PKC. En respuesta a una variedad de estímulos (hormonas, GF y citoquinas) la PKB citoplasmática inactiva es reclutada en la membrana plasmática. PKB es fosforilada en un resto de treonina por la quinasa PDK1 (**PDK1**, por *Phosphoinositide-Dependent Kinase 1*) cuya actividad depende estrictamente de lípidos fosforilados en 3'-inositol y en un resto de serina por otra quinasa que aún no está bien identificada. Esta doble fosforilación activa totalmente a PKB y luego diferentes sustratos son fosforilados, entre otros, las proteínas BAD y procaspasa-9 (proapoptóticas, inhibidas por esta fosforilación), la quinasa GSK-3 α / β y la proteína regulatoria CREB. La gran variedad de proteínas fosforiladas por PKB explica la

relevancia de PKB como un mediador de la proliferación, diferenciación y supervivencia celular (Downward 1998; Neri et al 2002).

Quinasa de la glucógeno sintasa (GSK-3). Es una serina / treonina quinasa de proteínas que está involucrada en múltiples procesos celulares y asociada con la patogénesis de enfermedades como el Alzheimer y la Diabetes mellitus de tipo 2. Se han descrito dos isoformas de GSK-3 (α y β) y son ubicuamente expresadas en las células y los tejidos. La GSK-3 es constitutivamente activa en las células y su actividad es inhibida por insulina, GF y ésteres de forbol. La insulina activa la vía PI3-K / PKB e inactiva la GSK-3. La inactivación es debida a la fosforilación de la serina 9 para GSK-3 β y de la serina 21 para la GSK-3 α . Además, puede ser fosforilada en un resto de tirosina. El uso de un mutante inactivo de GSK-3 mostró que la enzima se autofosforila en este resto de tirosina, mediante el cual incrementa su actividad. Otros agentes como NGF y estaurosporina podrían también incrementar la fosforilación en tirosina de la GSK-3.

La fosforilación de sustratos por GSK-3 generalmente los inactiva. Por ejemplo, fosforila la glucógeno sintasa e inhibe su actividad, fosforila a factores de transcripción como c-jun, C/EBP y NF-AT e inhibe su unión al ADN y además fosforila al IRS-1 inhibiendo la señal de la insulina (Plyte et al 1992; Eldar-Finkelman y Krebs 1997; Grimes y Jope 2001).

Se ha encontrado que pacientes con DM de tipo 2 poseen altos niveles de GSK-3, mayores a los encontrados en controles normales. Esto contribuiría a la patogénesis de la Diabetes mellitus de tipo 2 (Nikoulina et al 2000). La GSK-3 también estaría implicada en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer al afectar diferentes proteínas relacionadas con esta patología y promover la apoptosis, aportando más evidencia a su asociación con este tipo de enfermedad (Eldar Finkelman 2002)

Estudios con células *knockout* para GSK-3 mostraron que es requerida para la supervivencia celular (Hoeflich et al 2000), sugiriendo que es necesaria para controlar diferentes procesos celulares. Sin embargo, la sobreexpresión de GSK-3 o un aumento no controlado de su actividad puede ser perjudicial para la célula. Se ha sugerido que su actividad podría ser regulada por dos mecanismos independientes, uno relacionado con la fosforilación en tirosina y otro con la fosforilación en serina (Eldar Finkelman 2002).

El litio es un inhibidor de la GSK-3 y causa la activación de la glucógeno sintasa e inhibición de la apoptosis (Phiel y Klein 2001). Diferentes compañías farmacéuticas están desarrollando

inhibidores de la GSK-3 que podrían ser utilizados en el tratamiento de enfermedades como el Alzheimer y la Diabetes mellitus de tipo 2 (Eldar Finkelman 2002).

Quinasa de proteínas ribosomales (p70 S6K). Hay suficiente evidencia que indica que la activación de la PI3-K y la subsecuente activación de PDK / PKB están involucradas en la activación de la p70S6K. La fosforilación de ocho sitios activa totalmente la quinasa de proteínas ribosomales que induce la expresión de genes y síntesis de proteínas (Cheatham et al 1994; Shepherd et al 1998).

Fosfatasa de proteínas (PP-1 y PP-2A). La insulina regula fosfatasas de serina como PP-1 y PP-2A por una vía dependiente de PI3-K. Estas fosfatasas controlan la fosforilación de algunas de las proteínas involucradas en las señales que desencadenan parte de los efectos de la insulina (Jaumot y Hancock 2001).

1.2.3.3. Consecuencias biológicas de la activación de la PI3-K.

Hallazgos en diferentes sistemas experimentales indican que la PI3-K juega un papel crítico en la regulación del crecimiento y la proliferación celular. La inhibición de la PI3-K es capaz de bloquear los efectos metabólicos tanto de la insulina como del IGF-I (Cheatham et al 1994).

La diferenciación celular también es inhibida por wortmanina o LY294002, ambos inhibidores de la PI3-K. Esto sugiere que esta vía participa de procesos relacionados con la transformación celular (Tomiyama et al 1995).

Como se mencionó anteriormente, la PI3-K está implicada en la supervivencia celular (Blalock et al 2003). La apoptosis es un mecanismo natural de muerte celular programada. Se demostró que la vía PI3-K / PKB inhibe procesos apoptóticos al fosforilar proteínas como BAD y procaspasa-9 relacionadas con la apoptosis (Datta et al 1997; Allan et al 2003).

La regulación plasmática de la glucosa es uno de los procesos más importantes mediados por la insulina. Un mecanismo clave en este proceso es la habilidad de la hormona para estimular la translocación de los transportadores de glucosa (GLUT-4, por *Glucose Transporter-4*) del citoplasma a la membrana plasmática y así incrementar la captación periférica de glucosa por el músculo y los adipocitos. La primera evidencia de que la PI3-K era necesaria para este proceso surgió cuando concentraciones nM de wortmanina bloquearon totalmente la

translocación de los GLUT-4 (Kanai et al 1993). Las proteínas que estarían involucradas entre la PI3-K y la translocación de los GLUT-4 a la membrana aún no se conocen con exactitud. La proteína Rab4 es una de las candidatas más importantes propuestas para mediar este proceso (Le Marchand-Brustel et al 1995).

La síntesis de glucógeno es uno de los mecanismos celulares de acumulación de energía. La insulina promueve su síntesis y la PI3-K estaría involucrada en algunos de los eventos desencadenados para tal fin. Éstos están relacionados con la activación de la glucógeno sintasa al promover su desfosforilación e inhibir la GSK-3 (Kahn 1997).

Otros efectos sobre el metabolismo celular promovidos por la insulina son la glucólisis, lipogénesis, síntesis de proteínas y modificación de las proteínas del citoesqueleto; la PI3-K tendría un papel en la regulación de estos procesos (Shepherd et al 1998).

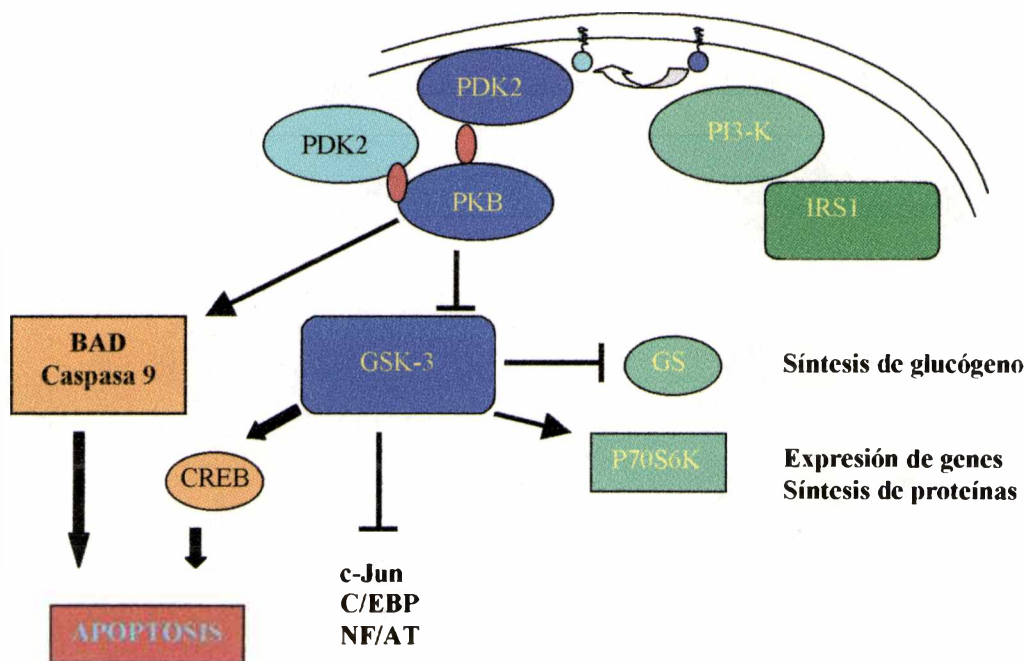


Diagrama 2. Esquema de la vía de la PKB

1.3. Tratamiento farmacológico de la Diabetes mellitus.

Los primeros intentos en tratar la Diabetes mellitus con extractos pancreáticos se realizaron a comienzos del siglo pasado y en 1922 con el descubrimiento de la insulina se administró por primera vez la hormona a pacientes con DM observándose una mejoría de los mismos. Banting y Macleod recibieron el premio Nobel en Medicina y Fisiología en 1923 por aislar y purificar la insulina de páncreas aislados (Banting et al 1922; Bliss 1982).

1.3.1. Tratamiento con insulina.

La disponibilidad de la insulina que fuera introducida en Europa por Hoechst hace más de 75 años, revolucionó el tratamiento de la Diabetes mellitus. Esta hormona, de naturaleza proteica, se administra usualmente por vía intravenosa, intramuscular y subcutánea, siendo esta última la elegida para tratamientos prolongados. Según su duración, las preparaciones de insulina pueden clasificarse en: insulinas de acción corta, intermedia o prolongada. De acuerdo a la especie de origen se denominan insulina humana, porcina, bovina y recombinante. La insulina recombinante revolucionó el tratamiento de la Diabetes mellitus. Las diferencias más importantes entre ésta y la insulina animal están relacionadas con la farmacocinética y la inmunogenicidad. La hipoglucemia es la reacción adversa más frecuente en los tratamientos con insulina y es el principal riesgo que debe tenerse en cuenta al diseñar un tratamiento (Lee y Zinman 1998).

1.3.2. Últimos avances en el tratamiento de la Diabetes mellitus.

Entre las nuevas metodologías para el tratamiento de DM con insulina, cabe mencionar el uso de insulinas alternativas, nuevas vías de administración, dispositivos de liberación intraperitoneal, píldoras implantables, páncreas artificial de asa cerrada, trasplante de células de los islotes de Langerhans y terapia génica. El desarrollo de análogos de la insulina que puedan mimetizar su secreción fisiológica ha sido un gran desafío de la Farmacología y la Medicina de los últimos veinte años (Lee y Zinman, 1998).

Con el objetivo de disminuir la tendencia a la dimerización de la insulina se ha transformado su estructura logrando modificar la farmacocinética y, de esta forma, cada administración se asemeja más aún a la respuesta fisiológica del páncreas. La insulina Lispro es la más estudiada en este aspecto hasta el momento (Holleman y Hoekstra 1997), sin embargo se están desarrollando otros tipos de análogos de insulina de acción rápida, tales como la B28 Asp, B10 Asp, B9 Asp y la B27 Glu (Lee y Zinman 1998). Además, se está trabajando en insulinas lentas como la insulina B30 o NN-304 (Markussen et al 1996). Hasta el momento, los resultados son alentadores comparados con la insulina NPH; además, tienen menores efectos mitogénicos que la insulina humana y no forman cristales, pudiendo ser administradas en solución.

Actualmente se investiga sobre nuevas formas y vías de administración de la insulina, tales como bombas, ultrasonido, nasal, oral, rectal e implantación subcutánea de píldoras. Las bombas liberan la insulina intraperitonealmente o intravenosamente evitando las inyecciones diarias (Dunn et al 1997). La administración intranasal es simple pero tiene baja biodisponibilidad (5 a 10 % y produce irritación de la mucosa) (Hilsted et al 1995). La más reciente invención es el uso de ultrasonido para una liberación de insulina transdérmica. El ultrasonido incrementa la permeabilidad de la piel, sin embargo es una metodología que se encuentra aún en desarrollo (Johannesen et al 1997).

Otros tratamientos alternativos son los trasplantes de páncreas o de islotes y la terapia génica. Se están realizando estudios en primates y humanos de trasplante de islotes pancreáticos para controlar la Diabetes mellitus. Los resultados obtenidos son alentadores ya que, por ejemplo, se ha podido normalizar la glucemia sin producir hipoglucemia (Kenyon et al 1998). Los principales inconvenientes son los efectos que producen los inmunosupresores sobre la funcionalidad de los islotes y la inflamación en la región hepática donde fueron transplantados (Kenyon et al 1999). La terapia génica ofrece a los pacientes diabéticos la posibilidad de no inyectarse insulina diariamente. Pueden extraerse células somáticas del paciente para luego transformarlas por ingeniería genética en productoras de insulina y esto no requiere de inmunosupresión (Stewart et al 1994).

1.3.3. Hipoglucemiantes orales.

Los fármacos secretagogos de insulina son apropiados en estadios tempranos de Diabetes mellitus tipo 2. Las células β del páncreas aún funcionan y la hiperglucemia se produce rápidamente después de la ingestión de alimentos debido a que se ha perdido la fase temprana de secreción de la insulina. Un secretagogo de rápida asimilación y corta duración es el adecuado en estos casos. Cuando la Diabetes mellitus de tipo 2 es avanzada se pierde la funcionalidad del páncreas y ya no resulta efectivo el uso de este tipo de drogas. En los casos donde el páncreas produce escasa insulina tampoco conviene usarlos como hipoglucemiantes. En estos pacientes son efectivos otros fármacos con diferente mecanismo de acción.

Hay tres clases de secretagogos: sulfonilureas, meglitinidas y derivados de D-fenilalaninas (Lebovitz 1999). El primer grupo desarrollado de **sulfonilureas** incluye la tolbutamida, acetohexamida, tolazamida y clorpropamida. La segunda generación, más potente y con menores efectos colaterales, incluye la gliburida (glibenclamida), glipizida y gliclazida. Las sulfonilureas de primera generación han sido usadas extensamente, pero producen hipoglucemia severa, además de otros efectos colaterales (Lebovitz 1999).

Gliburida o glibenclamida es el secretagogo más utilizado actualmente durante los primeros 5 años de diagnosticada la Diabetes mellitus de tipo 2. Las dificultades encontradas con glibenclamida son la larga duración de su acción, seria hipoglucemia, ganancia de peso y falta de selectividad por los canales de K_{ATP} de las células β del páncreas. **Glimepirida**, otra sulfonilurea, posee mayor selectividad por los canales K_{ATP} de las células β que por los del tejido cardiovascular.

Repaglinida pertenece a la clase de las meglitinidas y posee el mismo mecanismo de acción que las sulfonilureas, pero se une a un sitio diferente en el canal de K_{ATP} . A diferencia de los demás, su acción comienza a los 30 minutos y es corta en el tiempo, siendo capaz de reproducir la fase temprana de secreción normal de insulina.

Nateglinida es un secretagogo de la clase de las D-fenilalaninas. Se ha demostrado que estimula la secreción de insulina y reduce la hiperglucemia postprandial. También disminuye la producción hepática de glucosa y la hemoglobina glicada (Shiba 2003).

Las Biguanidinas son otro grupo de medicamentos utilizados para el tratamiento de la Diabetes tipo 2 y el primer fármaco desarrollado a partir de las éstas fue la fenformina, pero

debido al incremento en la acidosis láctica que producía fue retirada del mercado. Posteriormente se sintetizaron nuevos derivados más eficaces y con menores efectos colaterales (Schafer 1983). La **metformina** es una biguanidina que se usa ampliamente en el mundo para el tratamiento de la Diabetes mellitus de tipo 2. Es un antihiperglucemiante y no causa liberación de insulina del páncreas ni hipoglucemia. El efecto antihiperglucemiante se debería a una sensibilización de los tejidos periféricos a la insulina (Bailey 1992) y a una reducción de la producción hepática de glucosa (Stumvoll et al 1995) y de la glucógenolisis (Cusi et al 1996).

Troglitazona, Rosiglitazona y Pioglitazona son fármacos que pertenecen al grupo de las tiazolidinadonas que están siendo utilizadas para el tratamiento de la DM de tipo 2 siendo el más potente de los tres la rosiglitazona (Hofmann y Colca 1992; Wolffenbuttel et al 2000). La troglitazona es menos activa y en los últimos años esta droga fue retirada del mercado por su hepatotoxicidad (Watkins y Whitcomb 1998). El mecanismo de acción, aunque no bien establecido, parece estar mediado por los receptores denominados PPAR- γ (**PPAR**, por *Peroxisome Proliferation Activated Receptor*) (Cohen et al 2004). La hepatotoxicidad parece ser mucho menor con rosiglitazona y pioglitazona, aunque la *Food and Drug Administration* (FDA) recomienda controles mensuales de las enzimas hepáticas durante los primeros 3 a 6 meses de tratamiento.

Las drogas que disminuyen la absorción y digestión de carbohidratos en el tracto gastrointestinal pueden retrasar y reducir la hiperglucemia postprandial. Esto se logra reduciendo la digestión con inhibidores enzimáticos, alterando el tránsito gastrointestinal y atrapando físicamente los nutrientes evitando la absorción. Los fármacos inhibidores de la α -glucosidasa, como la **acarbosa**, **voglibosa** y **miglitol** reducen la absorción intestinal de almidón, dextrina y disacáridos al inhibir las enzimas que los hidrolizan, denominadas α -glucosidasas. De esta forma, producen una disminución en el aumento postprandial de la glucosa plasmática. Estas drogas no producen una disminución importante del peso corporal. Los mecanismos de acción son similares pero no iguales entre sí (Lebovitz 1998).

1.3.4. Terapias alternativas para el tratamiento de la Diabetes mellitus.

Actualmente se están estudiando diferentes drogas para el tratamiento de la Diabetes mellitus. Algunas están relacionadas con la acción de la insulina, insulinoanálogos e

insulinopotenciadores; otras regulan la producción hepática de glucosa y la utilización periférica de la misma. Dentro del grupo de los insulinoanálogos se encuentran la vitamina K₃ que incrementa el metabolismo de la glucosa; el dicloroacetato que estimula la actividad de la piruvato deshidrogenasa y el vanadio, un activador de la vía de transducción de señales que utiliza la insulina. El vanadio ejerce diferentes efectos insulinoanálogos en el metabolismo y la homeostasis de la glucosa, así como en el metabolismo de los lípidos. Estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado su importancia como potencial agente terapéutico para el tratamiento de la Diabetes mellitus. Se proponen diferentes mecanismos de acción para el vanadio, entre los más importantes cabe mencionar que es un inhibidor de fosfatasas y PTPasas. En la próxima sección se describen detalladamente las propiedades químicas, bioquímicas y farmacológicas de los compuestos de vanadio.

2. DIABETES Y VANADIO.

2.1. Antecedentes históricos y relevancia farmacológica de los complejos de vanadio.

A fines del siglo XIX se realizaron en Francia los primeros tratamientos de pacientes con Diabetes mellitus mediante la administración de sales inorgánicas de vanadio tales como ortovanadato y metavanadato de sodio. En los pacientes diabéticos se observó una mejoría en la glucosuria de los mismos, pero se determinó también la presencia de efectos colaterales adversos en este tipo de tratamiento (Lyonnet y Martin 1899). Posteriormente, se sugirió que el vanadio podría ser un elemento esencial para los seres vivos; sin embargo la esencialidad en humanos no está aun completamente determinada (Nielsen 1990).

A partir de 1922, con el descubrimiento de la insulina, mejoraron las expectativas y calidad de vida de los pacientes diabéticos, siendo hasta ahora el único tratamiento posible para los diabéticos de tipo I. Sin embargo, el uso farmacológico de la insulina presenta diferentes inconvenientes y reacciones adversas que ya hemos mencionado. Muchos de estos problemas se deben a su forma de administración y el rechazo de los pacientes a inyectarse insulina diariamente. Además, la hormona no es adecuada para la administración oral pues se destruye en el tracto gastrointestinal. El progresivo deterioro del metabolismo de la glucosa en los pacientes con Diabetes mellitus de tipo II es debido, en gran parte, a la disminución de la sensibilidad de los tejidos a la insulina. Por lo tanto, agentes que puedan mimetizar los efectos

de la insulina, disminuir las necesidades diarias de la misma o aumentar la sensibilidad de los tejidos a la hormona, podrían ser útiles en el tratamiento de las dos formas más frecuentes de Diabetes mellitus. Es por ello de gran interés el desarrollo de drogas alternativas a la insulina, de administración oral, que sean capaces de reproducir los efectos de la hormona. Las drogas de administración oral que son utilizadas actualmente para el tratamiento de la Diabetes mellitus de tipo 2 no mimetizan los efectos de la insulina, sino que estimulan su liberación, potencian su acción o disminuyen la producción hepática de glucosa.

En 1980 renace el interés hacia los compuestos de vanadio como potenciales fármacos de administración oral para el tratamiento de la DM debido a sus efectos insulinomiméticos. Además, los derivados de vanadio son una importante herramienta para el estudio de los mecanismos moleculares subyacentes en la patología de la Diabetes mellitus (Heyliger et al 1985; Sekar et al 1996; Goldfine et al 1998). Experimentos realizados mediante la administración de vanadato a modelos de animales diabéticos mostraron una normalización de la glucemia, pero los tratamientos crónicos con este compuesto causaron efectos tóxicos en los animales de experimentación (Heyliger et al 1985; Sabbioni et al 1991; Nakai et al 1995). Por otro lado, pruebas realizadas con el catión vanadilo demostraron su capacidad insulinomimética así como también menores efectos tóxicos (Dai et al 1994). Sin embargo, dosis terapéuticas de vanadilo no pueden ser administradas debido a su baja solubilidad en los fluidos corporales. La baja solubilidad y escasa absorción intestinal del vanadilo(IV) producen irritación y problemas gastrointestinales. Estos hechos llevan a focalizar el interés de la investigación en el desarrollo de nuevos compuestos de vanadio que sean apropiados para la administración oral. Lograr un aumento de la absorción, solubilidad y potencia disminuiría las dosis requeridas para su efectividad y de esta forma se reducirían los efectos tóxicos relacionados con la concentración de vanadio. Estos compuestos deberán conservar sus propiedades insulinomiméticas, ser estables, solubles en condiciones fisiológicas, no tóxicos y ser capaces de controlar los niveles de glucosa *in vivo* sin efectos colaterales.

Dada la importancia que presenta la química de coordinación del vanadio es necesario hacer una revisión de estos aspectos.

2.2. Química del vanadio.

2.2.1. Descubrimiento y fuentes.

El vanadio fue descubierto en 1803 por el químico español Andrés M. Del Río, en México, a partir del mineral de plomo vanadinita ($\text{Pb}_5(\text{VO}_4)_3\text{Cl}$) y lo llamó *pancromio* por la variedad de colores que presentan las sales del elemento al variar el pH. Mas tarde, Del Río lo rebautizó eritronio (*erythronium*) debido al color rojo que presentan algunas de sus sales en medio ácido, pero luego pensó que se trataba de una nueva forma de cromo y se desdijo de su descubrimiento. El vanadio fue redescubierto en 1830 por el químico sueco Nils Sefström en minerales de hierro. Por su variedad de colores en solución debidos al cambio de pH y concentración, se lo denominó vanadio en honor a *Vanadis*, la diosa de la belleza en la mitología Nórdica, (Nriagu 1998).

El vanadio es un elemento traza que se encuentra naturalmente en diversos minerales, el agua y los seres vivos. El primer depósito de minerales que contiene vanadio fue descubierto en Perú en 1905. Posteriormente, se hallaron diferentes reservas de vanadio en forma de minerales como la patronita (VS_4), arcillas, minerales de hierro y rocas basálticas. Es el segundo metal de transición en disolución más abundante en el océano (20 – 35 nM), inclusive más que el hierro (2,5 nM). En la atmósfera, el vanadio se encuentra mayoritariamente como óxido y proviene de la combustión del petróleo o algunos de sus subproductos (95 %), del carbón vegetal (4 %) y el 1 % restante de otras fuentes. La concentración de vanadio en la atmósfera varía mucho con la región y la industrialización del petróleo. En zonas urbanas puede ir de 10 a 100 ng / m³ y en ciertos lugares alcanza los 1500 ng / m³ (Nriagu y Pirron 1998; Mamane y Pirrone 1998).

Tecnológicamente, el vanadio se utiliza para aleaciones metálicas con hierro. El V_2O_5 es usado como catalizador en la industria del ácido sulfúrico y diferentes reacciones donde interviene el vanadio. Además, sus sales poseen diferentes propiedades biológicas y farmacológicas (*vide infra*).

2.2.2. Propiedades fisicoquímicas del vanadio.

El vanadio presenta diferentes estados de oxidación (desde -1 a + 5) siendo los estados (+3), (+4) y (+5) los más relevantes en sistemas biológicos. En solución acuosa, el vanadato (vanadio(V)) y el vanadilo (vanadio(IV)) presentan diferentes reacciones de hidrólisis y condensación. Los productos obtenidos varían con el pH, la concentración de vanadio y ligandos que pueden formar complejos con diferentes geometrías de coordinación. Una característica importante de las soluciones acuosas ácidas de vanadio es que el vanadilo (VO^{2+}) se encuentra en forma de catión, mientras que el vanadato es un anión, excepto a pH inferior a 3 donde está presente como catión pervanadilo, denominado comúnmente como VO_2^+ .

Otro factor a tener en cuenta es el par $\text{H}_2\text{VO}_4^- / \text{VO}^{2+}$ que posee un potencial redox de alrededor de 1,31 V, mientras que el par $\text{H}_2\text{O} / \text{O}_2$ es de 1,24 V y el par $\text{NADH} / \text{NAD}^+$ es de -0,32 V a pH fisiológico. El vanadato puede ser reducido por moléculas biológicas que proporcionen el potencial requerido, como el glutatión, el ascorbato y el NADH. El vanadilo reacciona espontáneamente con el oxígeno para formar vanadato y superóxido; luego el superóxido forma, con el vanadato, un complejo peroxovanadilo que puede oxidar al NADPH (Liochev y Fridovich 1990).

El vanadio en estado de oxidación (IV) y (V) forma una amplia variedad de complejos con diferentes ligandos orgánicos e inorgánicos. La importancia bioquímica de las reacciones del vanadio con restos funcionales como grupos hidroxilatos, carboxilatos, fenolatos, imidazolatos, tiolatos, entre otros donores de electrones, reside en que estos grupos forman parte de sitios activos de enzimas y de moléculas biológicas. Dada la analogía del vanadato con el fosfato, es razonable esperar que participen de reacciones similares con proteínas y otras biomoléculas. Se ha demostrado que el vanadato podría formar uniones de tipo éster con diferentes ligandos similares a las que forma el fosfato y esta podría ser una de las bases del mecanismo de acción de algunos de sus efectos biológicos, particularmente la inhibición enzimática de ciertas fosfatasas. El vanadio (V) origina diferentes especies con el fosfato a pH fisiológico. Entre los más importantes están: $\text{HVPO}_7^{3-} / \text{H}_2\text{VPO}_7^{2-}$ y $\text{HVP}_2\text{O}_{10}^{4-}$. Por otro lado, a diferentes valores de pH, el vanadilo forma complejos con el ATP y el fosfato más fuertes que el vanadato (Rehder 1995).

2.2.3. Química del vanadio (IV).

El vanadilo se encuentra en forma de $(VO(H_2O)_5)^{2+}$ en soluciones acuosas ácidas (pH: 2 o inferior) formando una bipirámide de base cuadrada y es comúnmente abreviado como VO^{2+} . Si comenzamos a incrementar el pH, el VO^{2+} sufre la hidrólisis de la molécula de agua que ocupa la posición axial, quedando ese lugar ocupado por un OH. Luego, a pH superior a 4,0 comienza a formarse hidróxido de vanadilo el cual es altamente insoluble y además forma especies poliméricas de espín apareado que son silenciosas al EPR, haciendo más complejo el estudio de estas sustancias. Hay diferentes formas poliméricas insolubles, las concentraciones de vanadilo monomérico hidratado en equilibrio se encuentran entre 10^{-6} y 10^{-9} M, dependiendo del pH específico. Sin embargo, el vanadilo forma diferentes complejos con especies oxigenadas, nitrogenadas y sulfuradas que pueden prevenir la formación de especies poliméricas insolubles. En estudios *in vitro* es importante la elección de la solución reguladora ya que el vanadilo forma complejos, inclusive con amortiguadores como el carbonato (Crans et al 1989).

El vanadilo es capaz de formar complejos con diversos aniones como carbonatos, fosfonatos, fosfatos, piridinas, imidazoles, aminas, sulfidrilos y carboxilos, entre otros. Un grupo de ligandos importantes desde el punto de vista biológico son los nucleótidos y ácidos nucleicos, donde el grupo fosfato está involucrado en la coordinación del vanadilo. Diferentes ligandos de interés biológico contienen más de un átomo donador de electrones que forma complejos fuertes con el catión vanadilo. De particular interés son los ácidos hidroxycarboxílicos, fosfocarboxilatos, nucleósidos, nucleótidos y catecoles. Los complejos con carboxilatos y tiolatos parecen ser más fuertes que los formados con nitrógenos amínicos. Se han hecho muchos estudios en torno de la química del vanadio y su interacción con diferentes proteínas. El VO^{2+} es capaz de reemplazar y desplazar a diferentes cationes de la estructura de las proteínas y en otros casos es requerido como cofactor de ciertas enzimas. Por ejemplo, el Zn^{2+} puede ser sustituido por el vanadilo en la carboxipeptidasa A sin modificar su actividad. La albúmina sérica forma complejos más estables con el VO^{2+} que con el vanadato. La transferrina y la ferritina dan origen a complejos de vanadilo los cuales son importantes ya que estarían relacionados con su transporte y acumulación en los seres vivos (Chasteen 1995).

El vanadio(IV) puede adoptar diferentes geometrías de coordinación dependiendo del ligando. Se han aislado y descripto diferentes complejos vanadilo-proteína (Chasteen 1995). Dada la

flexibilidad estructural de las proteínas logran complejar al catión VO^{2+} el cual luego adopta los requerimientos geométricos impuestos por la estructura de la proteína. Las geometrías descriptas para el vanadilo incluyen pirámide y bipirámide de base cuadrada y octaédrica. Otra geometría posible es la bipirámide trigonal, que es un análogo estructural del intermediario de reacción de hidrólisis del fosfato, la que es posible lograr por la flexibilidad estructural de las proteínas.

Los hidratos de carbono son uno de los grupos de compuestos más importantes y abundantes en la naturaleza. La interacción de los azúcares con el vanadio es de considerable interés en el campo de la bioinorgánica y de la bioquímica de este metal (Baran 1995). Así, el estudio de compuestos modelos del catión vanadilo(IV) con mono y disacáridos es de relevancia en el entendimiento de procesos relacionados con el metabolismo y detoxificación biológica del vanadio en los seres vivos (Baran 2001).

Es bien conocido que los carbohidratos son agentes reductores eficientes del vanadato, generando el catión vanadilo(IV), probablemente la especie biológicamente activa más importante del vanadio. Por otro lado, el hecho de que residuos de azúcares están presentes en importantes biomoléculas genera un interés adicional en el estudio de complejos de azúcares y ligandos relacionados con el catión VO^{2+} . Hasta el momento se han sintetizado y caracterizado diferentes complejos de vanadilo con azúcares y sus derivados, estudiándose en el presente trabajo de tesis los efectos de los mismos sobre osteoblastos en cultivo (Etcheverry et al 1997; Williams et al 2000; Etcheverry et al 2001; Baran 2001).

2.2.4. Química del vanadio (V).

En estado sólido, el vanadato posee geometría tetraédrica, asumiéndose que esta estructura podría ser conservada en solución. Sin embargo, estudios en solución utilizando diferentes técnicas sugieren que la coordinación del vanadato en medio acuoso sería una bipirámide trigonal (Rehder 1995). Esta última estructura es muy similar al estado de transición del fosfato en reacciones de desfosforilación. En condiciones fisiológicas de pH, el vanadato en concentraciones menores a 0.1 mM existe predominantemente como anión monomérico (H_2VO_4^-) con un pKa de 7,91, pero en concentraciones mayores forma distintos oligómeros con diferente grado de protonación que dependen del pH, la concentración y la fuerza iónica (Rehder 1995).

El vanadato, al igual que el vanadilo, forma complejos con ligandos que poseen átomos donores de electrones. A diferencia del vanado(IV), los complejos de vanadio(V) con el carbonato y el fosfato son más débiles (Crans et al 1998). Además, el vanadato forma complejos con peróxidos, los cuales fueron muy estudiados por sus propiedades insulino miméticas (Kustin 1998). Los peroxovanadatos son altamente oxidantes y en ausencia de sustancias reductoras los diperoxovanadatos son estables frente a la hidrólisis a pH neutro y levemente alcalino.

El ion vanadato, en condiciones fisiológicas, forma complejos con compuestos hidroxílicos, alcohólicos y ácidos. Con alcoholes aromáticos forma ésteres como fenil o tirosil vanadatos, pero con bajas constantes de formación (1 M^{-1}). Con ligandos bidentados forma rápidamente complejos, generalmente de estequiometría 2:2 que fueron muy estudiados por su efecto inhibitorio sobre la ribonucleasa A (Kustin 1998).

2.2.5. Caracterización y detección de vanadio en sistemas acuosos, sólidos y biológicos.

La alta afinidad del vanadio (IV) y (V) por los diferentes ligandos donores de electrones hace difícil el estudio del vanadio en solución. Los complejos se encuentran en equilibrio con el ligando y el vanadio libre, la concentración de las diferentes especies dependerá, fundamentalmente, de las constantes de formación de los complejos y el pH. La elección de la solución reguladora de trabajo es importante para determinar qué tipo de especies podrían estar presentes. Los tioles y otros tipos de moléculas reductoras son capaces de reducir el vanadio(V) a vanadio(IV) y esto puede complicar más aún la interpretación de los resultados experimentales (Crans y Tracey 1998).

La caracterización fisicoquímica de los complejos de vanadio se puede realizar por las técnicas de análisis elemental, espectroscopía electrónica en solución y reflectancia difusa, espectroscopía IR, análisis termogravimétrico (TG), análisis térmico diferencial (DTA) y determinaciones de susceptibilidad magnética (Baran 1995).

En los últimos años hubo un importante avance en la química del vanadio debido a que hay nuevas herramientas y técnicas espectroscópicas para su estudio. El vanadio(V) es diamagnético (d^0) y puede estudiarse convenientemente con espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN). La espectroscopía $^{51}\text{VRMN}$ es una potente herramienta para estudiar las diferentes especies de vanadio(V) presentes en solución. El vanadio(IV) es

paramagnético (d^1) y puede estudiarse de forma adecuada con espectroscopia de resonancia paramagnética electrónica (RPE) y espectroscopía vibracional, entre otras. Para la determinación de vanadio en medios biológicos es necesario una preparación de la muestra, mineralización, métodos de separación y enriquecimiento. Los métodos de determinación de vanadio incluyen espectroscopía UV-visible y de absorción atómica, métodos voltamétricos y análisis de activación de neutrones, entre los más utilizados (Seiler 1995).

2.3. El vanadio en sistemas biológicos.

El gran interés de los investigadores por el vanadio en sistemas biológicos surgió al descubrirse que el vanadato era un inhibidor de la Na^+ / K^+ ATPasa, encontrado en preparaciones comerciales de ATP provenientes de músculo esquelético de equinos y conejos (Cantley et al 1977). Luego de este hallazgo se comenzaron a estudiar los efectos que producía el vanadio en diferentes sistemas enzimáticos, celulares y animales. Además, se encontró la presencia de vanadio en sistemas vivos como los tunicados, algas marinas y hongos. Se estudió su papel en este tipo de organismos y se estableció su esencialidad en plantas y animales, quedando aún por ser este aspecto determinado definitivamente en humanos.

La química de coordinación del vanadio en sistemas biológicos se centra mayoritariamente en los estados de oxidación (IV) y (V), sin embargo hay organismos, como los tunicados, en los cuales el principal estado de oxidación es el (III).

Los tunicados acumulan el vanadio por medio de ligandos denominados tunicromos y los hongos de la familia *Amanita* por medio de ligandos como la amavadina, ambos compuestos orgánicos son sintetizados por estos organismos para poder acopiar vanadio. Los tunicados son organismos que acumulan vanadio en cantidades sorprendentes, llegando a concentraciones superiores a 1 M en las células sanguíneas llamadas vanadacitos (Carlson 1975). Estas altas concentraciones de vanadio no se alcanzarían si estos organismos no tuvieran ligandos como la amavadina o los tunicromos.

Diferentes bromoperoxidasas y las nitrogenasas presentes en algas y bacterias contienen vanadio. Las haloperoxidasas son una familia de enzimas que catalizan la oxidación de halogenuros por peróxido de hidrógeno, proceso por el cual se puede obtener un compuesto orgánico halogenado y descomponer al peróxido de hidrógeno en oxígeno singulete. Con

respecto a las nitrogenasas de vanadio, su existencia fue propuesta a partir de la estimulación de la fijación de N_2 por vanadio. Esta nitrogenasa se expresa solo en presencia de vanadio y ausencia de molibdeno debido a que están genéticamente relacionadas con las nitrogenasas de Mo y Fe (Wever y Hemrika 1998).

2.3.1. Acciones biológicas del vanadio *in vitro*.

2.3.1.1. Inhibición enzimática.

Se han llevado a cabo diferentes estudios en torno a las acciones biológicas del vanadio, hasta el momento se conocen muchos de sus efectos *in vitro* e *in vivo*. El vanadio inhibe diferentes enzimas y entre ellas ATPasas, aunque no todas son inhibidas con igual potencia. Subsecuentemente, se ha encontrado que el vanadio inhibe diferentes fosfatasa, incluyendo fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina y tirosina fosfatasa de proteínas. Otras enzimas que son inhibidas por el vanadio son ribonucleasas, fosfodiesterasas, fosfoglucomutasa y glucosa-6-fosfatasa (Stankiewicz y Tracey 1995).

Las PTPasas activan o inhiben señales intracelulares que desencadenan diferentes efectos biológicos. *In vivo*, el contenido de proteínas fosforiladas es un equilibrio dinámico entre la actividad de las quinasas y las fosfatasa, mostrando que ambas tienen un papel preponderante en la regulación de procesos celulares. Las fosfatasa que tienen fosfoproteínas como sustrato se pueden clasificar dentro de dos grandes grupos: las que tienen especificidad para serina- / treonina-fosfato (**PS/TPasas**) y las fosfatasa para tirosina-fosfato. Todas catalizan la hidrólisis de ésteres fosfato. Las PS/TPasas son metaloenzimas que catalizan el ataque directo de una molécula de agua activa al átomo de fósforo del sustrato. Las PTPasas no son metaloenzimas y en su mecanismo de catálisis se forma un intermediario fosfocisteína. La cisteína del sitio activo es esencial para el funcionamiento de la enzima. Además, estas enzimas son diferentes estructural y mecanísticamente a las fosfatasa alcalina y ácida y a las fosfatasa que hidrolizan ésteres fosfato de moléculas pequeñas como la glucosa-6-fosfato (Zhang 1998).

Las fosfatasa alcalinas son metaloenzimas de membrana, todas son glicoproteínas, codificadas por distintos genes y clasificadas en tejido no específico, intestinal, placentaria y

derivada de células germinales. La fosfatasa alcalina tejido no específico por modificación posterior a su síntesis en riñón, hígado y hueso dan origen a la fosfatasa alcalina renal, hepática y ósea, respectivamente. Las fosfatasas alcalinas hidrolizan monoésteres de fosfato de pequeñas moléculas y proteínas, además transfieren grupos fosfato a moléculas orgánicas con grupos hidroxilo. El mecanismo de acción comprende la fosforilación de una serina presente en el sitio activo de la enzima y posteriormente se transfiere el grupo fosfato a una molécula de agua (fosfotransferasa) o a un aceptor orgánico (fosfotransferasa) (Van Hoof y De Broe 1994).

La habilidad del vanadato para inhibir este tipo de enzimas esta estrechamente relacionada con sus propiedades físicas y químicas. Estructuralmente, el vanadato es similar al fosfato y además posee mayor flexibilidad en su geometría de coordinación. Por lo tanto, es razonable esperar que ambos aniones participen de reacciones similares. La formación de un estado de transición estable entre la enzima y el vanadio parece ser la razón de la inhibición. Estudios de rayos X muestran que el vanadato se localiza en el sitio activo de la enzima formando una unión covalente con geometría de bipirámide trigonal. En ensayos con compuestos de vanadio de diferente geometría de coordinación se encontró que los complejos con coordinación cinco eran inhibidores más potentes que los compuestos con coordinación seis o siete (Crans y Tracey 1998). No obstante, todos los complejos estudiados inhibieron significativamente la actividad enzimática. Por otro lado, el arsenato es un inhibidor potente, al igual que el vanadato, de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa. Sin embargo, no es un inhibidor eficiente de la Na^+ / K^+ ATPasa. Por ejemplo, la bomba de protones dependiente de ATP no forma un estado de transición estable entre la enzima y el fosfato, sino que el vanadato formaría un complejo catalíticamente inactivo con el sustrato, actuando así como un inhibidor. Estos resultados sugieren que habría otros factores, además de la similitud con el fosfato, que estarían afectando la actividad enzimática (Crans y Tracey 1998; Kustin, 1998).

Las PTPasas como PTP 1B y LAR poseen una cisteína en su centro activo, si este resto es oxidado se inhibe su actividad enzimática irreversiblemente. Los complejos de vanadio a través de la generación de radicales libres y principalmente los peroxoderivados podrían oxidar esta cisteína (Crans 1998; Posner et al 1998; Cheng et al 2002). Estos aspectos muestran la importancia de las propiedades redox del vanadio y su relación con las PTPasas y las vías de transducción de señales.

Además del vanadato, el catión vanadilo también inhibe diferentes enzimas y, en algunos casos, es más potente que el vanadato. El mecanismo propuesto para esta inhibición se basa

en la posibilidad del vanadilo para adoptar una estructura de bipirámide trigonal debido a la flexibilidad de la conformación de las proteínas, similar a la del fosfato y ubicarse en el sitio activo de estas enzimas inhibiendo su actividad (Stankiewicz y Tracey 1995). Las PTPasas PTP1B y citoplasmática humana de bajo peso molecular son inhibidas en presencia del complejo de vanadilo con maltol (BMOV). Estudios de RMN y rayos X demostraron que la inhibición de las PTPasas en presencia de BMOV es debida al vanadilo "desnudo" que se ubica en el centro activo de la fosfatasa (Peters et al 2003). Estos datos sugieren que el vanadio sin complejar es el componente activo de estos compuestos. Además, el vanadilo puede participar, al igual que el vanadato, de reacciones vinculadas con la inhibición enzimática anteriormente descritas. Otra posibilidad, aunque más especulativa, es que el vanadilo mimetice al catión Zn^{2+} e inhiba la enzima. Se describieron diferentes casos de inhibición de PTPasas por 10 - 100 μM de Zn^{2+} (Brautigan et al 1981; Horlein et al 1982).

2.3.1.2. Activación enzimática.

En la mayoría de los casos la activación enzimática por vanadio es indirecta. Sin embargo, el vanadio puede estimular la actividad enzimática por formación de complejos con ligandos que mimetizan la estructura de sustratos fisiológicos. Por ejemplo, la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa es activada por vanadato. Otro mecanismo de regulación de la actividad enzimática está relacionado con las enzimas activadas o inhibidas por fosforilación en restos de tirosina. El vanadato forma ésteres con los restos de tirosina de estas enzimas mimetizando su fosforilación. Esta hipótesis podría explicar la activación por el vanadato de ciertas quinasas citosólicas y del receptor de insulina (Stankiewicz y Tracey 1998).

2.3.1.3. Efectos celulares del vanadio.

Luego de encontrar que el vanadio inhibe la Na^{+} / K^{+} ATPasa se comenzaron a diseñar diferentes experimentos *in vitro* con células en cultivo para estudiar y conocer sus efectos biológicos. Se encontró que el vanadio estimula la fosforilación de proteínas en restos de tirosina, aumenta los niveles de fosfoinosítidos, estimula la proliferación de diferentes líneas celulares, incrementa la captación de pequeñas moléculas e iones, entre otros efectos

insulinomiméticos. Por otro lado, se han descrito efectos antitumorales, tóxicos y transformantes en diferentes líneas celulares (Shechter 1990; Stern et al 1993; Djordjevic 1995; Domingo 2000; Srivastava 2000; Evangelou 2002).

2.3.1.3.1. Efectos del vanadio sobre la fosforilación de proteínas en células en cultivo.

La insulina, al igual que otros factores de crecimiento, estimulan la fosforilación de proteínas en restos de tirosina en células en cultivo. El vanadio también produce el mismo efecto, sin embargo presenta algunas diferencias (Mooney et al 1989)

Algunos autores encontraron que el vanadio, al igual que la insulina, estimula la autofosforilación del receptor de insulina en adipocitos (Fantus et al 1989), pero a través de mecanismos diferentes (Tamura et al 1983; Tamura et al 1984; Bernier et al 1988; Shisheva y Shechter 1992b; Kadota et al 1987). Estos efectos son dependientes del tejido y la especie animal. Así, en células de pulmón de rata y diafragma de conejo y ratón no se observó la autofosforilación del IR en respuesta al vanadio (Srivastava y Chiasson 1989; Strout et al 1989). Por otro lado, se ha descrito que la inhibición de la actividad tirosina quinasa del IR no suprime los efectos del vanadio sobre el metabolismo de la glucosa, sugiriendo una acción postreceptor de insulina (Shisheva y Shechter 1992b). El vanadio estimula quinasas de la vía de transducción de señales utilizada por la insulina posteriores al IR y el IRS-1, tales como las MAPKs y la PI3K. Para dilucidar este punto se realizaron experimentos en células de ovario de hamster chino (CHO) que no expresan receptores para insulina (Pandey et al 1998). En este tipo de células el vanadato y el vanadilo estimularon la fosforilación de proteínas de la vía de señalización utilizada por la insulina, tales como las ERKs, p70s6k y la p90rsk, las cuales a su vez fosforilan y, por lo tanto, regulan la acción de diferentes factores de transcripción, muchos de ellos relacionados con la proliferación celular. La PI3-K es otra de las proteínas importantes que media muchos de los efectos metabólicos y mitogénicos de la insulina. Esta quinasa de fosfoinosítidos se activa como resultado de la interacción entre proteínas. Por su parte, el vanadio parece promover este tipo de interacción. La activación de la PI3-K, en respuesta a la insulina, se produce por la interacción de su subunidad p85 con el IRS-1 fosforilado. Se demostró que el vanadio promueve esta interacción activando la PI3-K (Molero et al 1998). Además, la activación de la vía ras-MAPK por el sulfato de vanadilo sería dependiente de la PI3-K (Pandey et al 1995; Pandey et al 1999). En fibroblastos de ratón

Swiss 3T3 el ortovanadato estimuló la quinasa ribosomal S6 (**p90S6K o p90rsk**) (Novak-Hofer y Thomas 1985). Estos datos sugieren que los efectos del vanadato no serían dependientes del IR; además, las vías ras-MAPK y PI3-K mediarían algunos de los efectos insulinosimiles del vanadio.

La activación de las MAPKs por el vanadio podría ocurrir directamente por inhibición de fosfatasaes específicas duales de las MAPKs (**MKP-1**, por *Mitogen Kinase Phosphatase-1*) o por un aumento de la actividad de quinasas que se encuentran dentro de la vía en etapas previas, probablemente por inhibición de otro tipo de PTPasas. El vanadio regularía los niveles de fosfoproteínas de las vías de señalización intracelular a través de la inhibición de diferentes PTPasas. La mayoría de los datos soportan a idea de que la inhibición de las PTPasas sería el mecanismo por el cual el vanadio promueve los efectos insulinomiméticos (Fantus et al 1995; Nantel et al 1998; Kustin 1998; Shechter 1998).

Existen diferentes tirosinas quinasas que son mediadoras de diferentes efectos de la insulina y es posible que sean activadas por el vanadio. Se ha sugerido que el vanadato podría promover algunas de las acciones de la insulina a través de la activación de una quinasa citosólica de 53 kDa (**CytPTK**) (Shechter 1998). La CytPTK, a diferencia de las quinasas asociadas a membrana, no es inhibida por N-etilmaleimida; sin embargo, es más sensible a la estaurosporina que las quinasas mencionadas (Sekar et al 1996; Yki-Jarvinen 1992; Van Hoof y De Broe 1994). Estudios *in vitro* en adipositos de rata mostraron que sustancias como insulina, isoproterenol, dibutiril-AMPC, ácido okadaico, peróxido de hidrógeno y ésteres de forbol no modifican la actividad de la CytPTK en la medida que lo hace el vanadio (Shisheva y Shechter 1992a). Por lo tanto, esta vía podría ser alternativa a la que utiliza la insulina para ejercer sus efectos biológicos, sugiriendo que el vanadio podría ser una buena alternativa para el tratamiento de afecciones como la Diabetes mellitus.

2.3.1.3.2. Efectos del vanadio sobre la proliferación de células en cultivo.

Los factores de crecimiento estimulan la proliferación celular a través de la activación de receptores que desencadenan señales intracelulares activando finalmente diferentes factores de transcripción. La insulina estimula vías de transducción de señales como Ras-MAPK que estarían involucradas en los efectos mitogénicos de la hormona, por lo tanto agentes que activen este tipo de vías podrían mimetizar a la insulina. Además, hay PTPasas citosólicas con

dominios SH2 (SHP-2) que son necesarias para la activación de ras por la insulina. La inhibición de la SHP-2 es un mecanismo por el cual inhibidores de PTPasas podrían modular la acción mitogénica de la insulina.

Diferentes estudios de células en cultivo muestran que el vanadio tiene un comportamiento bifásico con respecto a la proliferación celular. Concentraciones entre 2,5 y 25 μM son inductoras de la proliferación celular, mientras que concentraciones mayores a 50 μM producen inhibición de la proliferación. Por otro lado, hay algunos derivados de vanadio que no tienen este comportamiento; comportándose solo como inhibidores de la proliferación celular, independientemente de la concentración utilizada para el ensayo. Por estas razones, los compuestos de vanadio tienen efectos contrapuestos y éstos dependerán de la dosis, de la especie de vanadio presente y del tipo celular.

El vanadato y el vanadilo en concentraciones entre 2,5 y 25 μM estimulan la proliferación de diferentes líneas de osteoblastos en cultivo (Cortizo 1995; Etcheverry y Cortizo, 1998). El vanadato estimula la síntesis de ADN en fibroblastos, mimetiza la acción del factor de crecimiento de fibroblastos aumentando el RNAm de c-fos y promueve la transición de la fase G0 a G1 del ciclo celular (Smith 1983; Wice et al 1987). Además, el vanadato potencia el efecto proliferativo del IGF-I en osteoblastos en cultivo (Lau et al 1988; Farley et al 1982).

Los efectos mitogénicos del vanadio pueden estar mediados por la vía de las MAPKs. Como se mencionó en la sección anterior, el vanadio activa indirectamente quinasas como las ERKs y la PI3-K. Las ERKs a su vez estimulan distintos factores de transcripción que promueven el ingreso de la célula en el ciclo celular (Pandey et al 1995; Pandey et al 1999). La activación de la PI3-K también podría estar relacionada con la acción mitogénica del vanadio, probablemente por un entrecruzamiento de las vías que como resultado active a las ERKs. La PI3-K activa a PKB y por esta vía podría aportar a la acción mitogénica del vanadio (Wilkinson y Millar 2000).

Otras vías activadas por el vanadio, que podrían estar relacionadas con el efecto proliferativo, son las de los fosfoinosítidos y las proteínas G heterotriméricas. En dosis de 100 μM el vanadio incrementa los niveles de inositol mono-, di- y trifosfato por mecanismos dependientes e independientes de tirosina quinasas (Randazzo et al 1992). Fueron reportados casos donde el vanadato activaría la vía de las proteínas G, sin embargo las dosis fueron de 3 a 10 mM, concentraciones muy superiores a las que producen efectos mitogénicos en las células (Paris y Pouyssegur 1987).

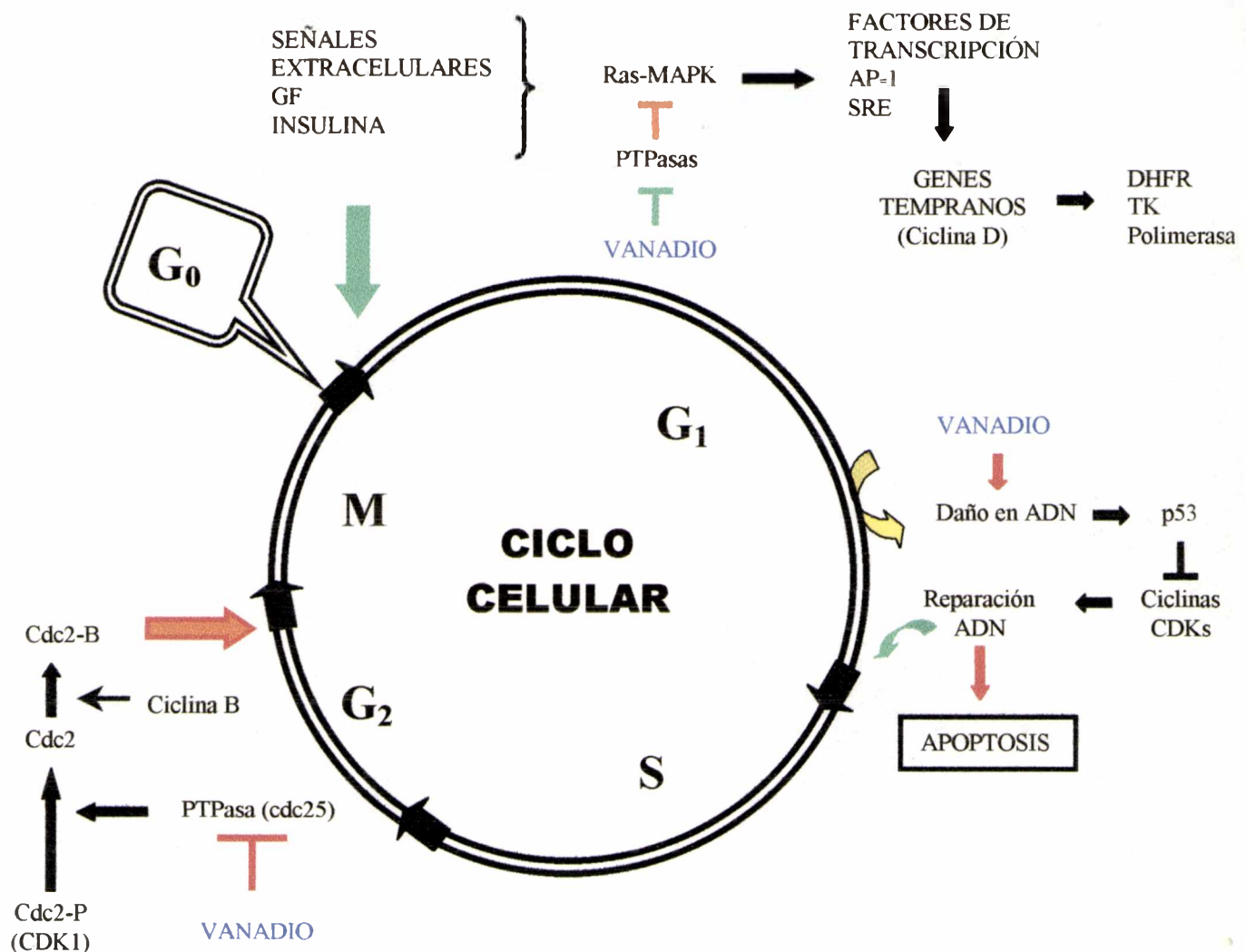


Diagrama 3. Esquema del ciclo celular con los posibles puntos de acción del vanadio

El vanadio tiene un comportamiento bifásico con respecto a la proliferación y, en algunos casos, solo se comporta como un inhibidor de diferentes líneas celulares. Por esta razón, ciertos compuestos de vanadio se estudian por sus propiedades antitumorales (Hanauske et al 1987; Djordjevic 1995; Taylor et al 1999; Evangelou 2002). Células tumorales humanas (**HTB-14**), hematopoyéticas de ratón (**MDAY-D2**) y células endoteliales de ratón (**EDMA**) son inhibidas por dosis de 5 a 50 μM de ortovanadato de sodio. En el mismo estudio se muestra que células en condiciones de activa proliferación son más sensibles a la inhibición por el vanadio (Cruz et al 1995). Se han sintetizado diferentes derivados de vanadio(IV) con potencial aplicación en el tratamiento del cancer. Entre ellos el bis(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina) sulfatooxovanadio(IV) (**Metvan**) fue el más promisorio. Metvan en

concentraciones nano y micromolares indujo apoptosis en diferentes células tumorales humanas. Además, mostró ser más efectivo que *cisplatin* en la inhibición de dos líneas de células provenientes de tumores de ovario y testículo. El mecanismo involucrado en estos efectos antitumorales parece estar relacionado con la inducción de apoptosis (D'Cruz y Uckun 2002)

Se han descripto una serie de PTPasas, por ejemplo, SHP2 / SYP (Milarski y Saltiel 1994; Xiao et al 1994) y fosfatasas específicas duales, por ejemplo, la *cdc25* (Baratte et al 1992) que están involucradas en la propagación de la proliferación celular. Se sugiere que el vanadio estaría actuando en estos puntos del ciclo celular inhibiendo este tipo de fosfatasas y como consecuencia la inhibición de la división celular. Tanto el vanadato (Hamaguchi et al 1995) como el pervanadato (Faure et al 1995) interrumpen el ciclo celular en la fase G2 / M. Para que el ciclo celular progrese en este punto se requiere de la activación del complejo quinasa dependiente de ciclinas (CDK1 /*cdc2*) – ciclina B que está sujeto a la desfosforilación de la quinasa *cdc2* por la fosfatasa *cdc25*. Recientemente se describió que peroxovanadatos son potentes inhibidores de la fosfatasa *cdc25*. Además, estos compuestos demostraron ser efectivos en la inhibición de 28 líneas celulares tumorales y en la inhibición del crecimiento de un tumor de mama implantado en ratones (Scrivens et al 2003).

En otro ensayo se estudió el efecto del vanadato sobre el ciclo celular y su relación con las especies de oxígeno reactivas (**ROS**). La incubación de células epiteliales de pulmón con vanadato (100 μ M) generó radicales hidroxilo, peróxido de hidrógeno y superóxido. Las ROS, al igual que el vanadato, indujeron un arresto en el ciclo celular en la transición G2 - M dependiente del tiempo de incubación y de la concentración. Este efecto parece ser debido a la inhibición de la PTPasa, *cdc25*, que controla el ciclo celular (Zhang et al 2001).

Dos líneas de células fibroblásticas de ratón, una de ellas deficiente en el gen supresor de tumores denominado p53, mostraron que el vanadio induce un arresto del ciclo celular en la transición G2-M en los fibroblastos deficientes en p53; sin embargo, en los fibroblastos normales el arresto se produciría en la fase S (Zhang et al 2002). Interesantemente, el bloqueo del ciclo celular en el estado de transición G2-M parece estar relacionado con la muerte celular (Farinelli y Greene 1996). Estos datos sugieren que el vanadio podría inhibir la proliferación de células tumorales por dos procesos: inducción de p53 e inhibición de la PTPasa *cdc25*.

Así, el efecto del vanadato sobre la proliferación dependerá del estado del ciclo celular, la concentración relativa de vanadio, la dependencia de PTPasas específicas y la génesis de las células tumorales. Mutaciones particulares podrían hacer las células más o menos sensibles a la acción del vanadio. Además, todos estos efectos sobre el crecimiento y la proliferación dependen de las concentraciones y especies de vanadio presentes en el medio de cultivo, mostrando en la mayoría de los casos un efecto bifásico.

2.3.1.3.3. Efectos del vanadio sobre la diferenciación de células en cultivo.

Uno de las propiedades más importantes de los factores de crecimiento es su habilidad para estimular la diferenciación celular. Estudios realizados con vanadio muestran cierta controversia con relación a la diferenciación celular ya que se han descrito efectos contrapuestos. Las acciones del vanadio sobre la diferenciación celular parecen ser mediados por la inhibición de PTPasas. La incubación de células HL-60 con ésteres de forbol (**PMA**) induce la diferenciación celular, efecto que fue potenciado por el vanadio y parece estar relacionado con la inhibición de PTPasas (Wei y Yung 1995). Los preadipocitos 3T3L1 se diferencian a adipocitos, transformación que está acompañada por un incremento en la actividad de PTPasas. La adición de vanadio en la etapa de activación de las PTPasas inhibió la diferenciación celular (Liao y Lane 1995). Estos datos sugieren que las PTPasas juegan un papel muy importante en la diferenciación de algunas líneas celulares y en estos casos el vanadio modula la expresión del fenotipo celular. Los osteoblastos en su etapa de diferenciación expresan, entre otras proteínas, colágeno y fosfatasa alcalina. Estudios de osteoblastos en cultivo muestran que el vanadio es capaz de estimular la síntesis de colágeno (Canalis 1985; Lau et al 1988). De esta forma, el vanadio participaría como un inductor de la diferenciación osteoblástica. Sin embargo, ensayos previos realizados en nuestro laboratorio muestran que el vanadio es un inhibidor de la fosfatasa alcalina expresada por los osteoblastos en su etapa de diferenciación. La actividad de la fosfatasa alcalina es inhibida en forma dependiente de la dosis, siendo el vanadato un inhibidor más potente que el vanadilo (Cortizo y Etcheverry 1995; Etcheverry et al 1997). En la etapa de formación ósea se requiere de una matriz extracelular, mayoritariamente de colágeno, donde se depositará la hidroxapatita produciéndose la mineralización. En esta etapa es necesaria la actividad de la fosfatasa alcalina para que se produzca un aumento de la concentración local de fosfato, requerida para

la mineralización. La inhibición de la actividad de la fosfatasa alcalina por el vanadio podría poner en riesgo la mineralización ósea y, de esta forma, afectar la formación del hueso.

2.3.1.3.4. Efectos del vanadio sobre el metabolismo de células en cultivo.

Las acciones más importantes de la insulina están relacionadas con el metabolismo celular, particularmente con el metabolismo de hidratos de carbono y lípidos. Además, el metabolismo proteico también está regulado por la insulina. Los efectos más rápidos sobre el metabolismo de los hidratos de carbono, mediados por la insulina, son el incremento de los transportadores de glucosa (GLUT-4) en la membrana plasmática y la síntesis e inhibición de la degradación de glucógeno. Además, estimula la glucólisis e inhibe la gluconeogénesis al desfosforilar la fructosa-2,6-bisfosfato quinasa y la piruvato quinasa. El pasaje de piruvato a acetil CoA también es modulado por la insulina al desfosforilar la piruvato deshidrogenasa. Por otro lado, la insulina promueve acciones que requieren de más tiempo e involucran cambios en la expresión de genes relacionados con el metabolismo celular (Denton y Tabaré 1997).

La insulina activa a la PI3-K que induce la translocación de los transportadores de glucosa desde el citoplasma a la membrana plasmática. Además, aumenta la síntesis *de novo* y actividad de los transportadores. El aumento en la síntesis de glucógeno es debido a la desfosforilación de la glucógeno sintasa por la fosfatasa 1. Por otro lado, agentes como la adrenalina, incrementan el cAMP e inhiben por fosforilación la glucógeno sintasa; efecto que es mediado por la quinasa de la glucógeno sintasa (**GSK-3**, por *Glycogen Synthase Kinase 3*) que a su vez es fosforilada e inhibida en respuesta a la insulina (Denton y Tabaré, 1997).

Gran parte de los efectos biológicos de la insulina son reproducidos por el vanadio en células en cultivo (Shechter 1990). Se encontró que el vanadato, al igual que la insulina, regula el metabolismo de los hidratos de carbono, los lípidos y las proteínas. El efecto del vanadio sobre las proteínas ha sido poco estudiado, sin embargo parece tener un efecto anabólico al estimular su síntesis e inhibir su degradación (Seglen y Gordon 1981). El metabolismo de los lípidos también es sensible a la acción del vanadio, el cual inhibe la lipólisis y estimula la síntesis de lípidos (Castro et al 1984; Tsiani et al 1997; Badmaev et al 1999).

Con respecto al metabolismo de los hidratos de carbono, el vanadio incrementa la captación y metabolismo de la glucosa en adipositos, hepatocitos y eritrocitos humanos (Tolman et al

1979; Dubyak y Kleinzeller 1980; Tamura et al 1983; Ninfali et al 1983; Bernier et al 1988). Estudios en adipocitos de rata mostraron que el vanadio estimula la captación y metabolismo de la glucosa; además, promueve la movilización a la membrana del transportador de glucosa (GLUT-4) (Shisheva y Shechter 1993; Molero et al 1998). En otro tipo de células, como los fibroblastos de ratón NIH3T3, el vanadato también estimula el consumo de glucosa al inducir un aumento en el RNAm del transportador de glucosa-1 (GLUT-1) (Mountjoy y Flier 1990).

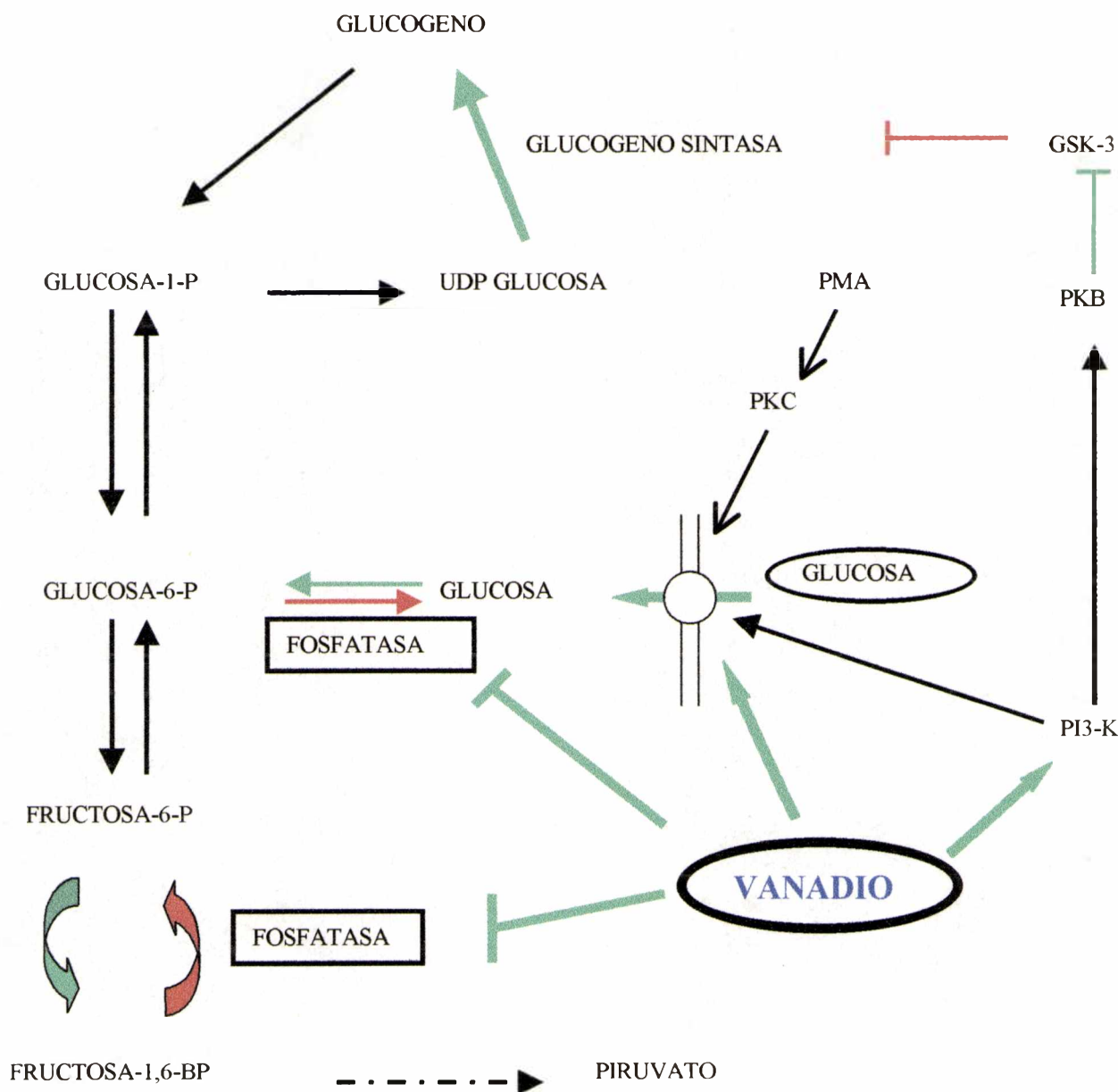


Diagrama 4. Diagrama de los posibles puntos de acción del vanadio sobre el metabolismo de la glucosa.

Con el objetivo de determinar los mecanismos involucrados en el metabolismo de la glucosa, estimulados por vanadio e insulina, se estudió en adipocitos la oxidación de la glucosa y su incorporación en los lípidos (lipogénesis) en presencia de estaurosporina, un inhibidor de PKC y quinasas citosólicas. La estaurosporina inhibió la lipogénesis y la oxidación de la glucosa estimuladas por el vanadato; mientras que para la insulina sólo la lipogénesis fue parcialmente inhibida. Por otro lado, la estaurosporina no inhibió la captación de glucosa estimulada por vanadato, sugiriendo que la activación de PKC y las quinasas citosólicas solo explicarían algunos de los efectos metabólicos del vanadio (Shisheva y Shechter 1993). El vanadato, al igual que la insulina, estimulan la síntesis de glucógeno y glucólisis en adipocitos de rata, pero utilizarían vías diferentes. La PI3-K y la fosfatasa-1 son requeridas por ambos; sin embargo, el vanadato promovería la síntesis de glucógeno y glucólisis a través de la activación de PKC y quinasas citosólicas en forma independiente del IR. Otro mecanismo utilizado por el vanadio para estimular el metabolismo de la glucosa, independiente del de insulina, es la inhibición de la glucosa-6-fosfatasa y la fructosa-6-fosfatasa (Pandey et al 1998; Sekar et al 1999). La acumulación de la glucosa-6-fosfato y la fructosa-6-fosfato estimulan la síntesis de glucógeno y la glucólisis.

2.3.1.3.5. Transformaciones morfológicas causadas por el vanadio en sistemas celulares.

En células Swiss 3T3 tanto el vanadato como el vanadilo producen transformaciones morfológicas del citoplasma y disminución de las conexiones intercelulares (Cortizo et al 1997). Además, en células osteoblásticas (MC3T3-E1) complejos de vanadio (IV) y (V) con maltol indujeron cambios en la morfología celular (Salice et al 1999). Por otro lado, el vanadato disminuye la adhesión y *spreading* celular en matrices de fibronectina, posiblemente por la alteración de los microtúbulos del citoesqueleto (Marchisio et al 1988; Edwards et al 1991; Brautigan et al 1981). La quinasa p60src interactúa con el citoesqueleto y su fosforilación se asocia con los cambios en la morfología celular (Rohrschneider y Rosok 1983). El vanadato produce la activación de esta proteína, sugiriendo que éste sería un mecanismo involucrado en las transformaciones morfológicas causadas por el vanadio en células en cultivo (Brown y Gordon 1984).

2.3.2 Acciones biológicas del vanadio *in vivo*.

El normal funcionamiento de los organismos vivos requiere de un balance cuidadoso y un equilibrio delicado de los diferentes elementos que ellos necesitan para realizar sus funciones vitales. Por lo tanto, un elemento esencial puede transformarse en tóxico, cuando se sobrepasan ciertos límites de concentración o en deficiente si está en defecto, causando también importantes daños.

La esencialidad de los elementos se determina sobre la base de criterios como: a) Una ingesta insuficiente produce deficiencias funcionales, las que pueden revertirse cuando el elemento recupera sus valores fisiológicos normales; b) El organismo no puede desarrollar su ciclo vital normal sin el elemento; c) El elemento debe poseer una influencia directa sobre el organismo y estar involucrado en sus procesos metabólicos; d) El efecto de un elemento no puede ser logrado totalmente por ningún otro elemento.

Los elementos esenciales forman parte, entonces, de un balance y equilibrio que puede esquematizarse en diagramas como los de Bertrand. Estos diagramas ilustran la relación entre la dosis o concentración de un determinado elemento y su efecto o respuesta biológica. Un diagrama alternativo, mediante el cual se puede comparar el comportamiento de un elemento esencial con el de uno tóxico, se muestra en el diagrama 6 (Baran 1995).

Diagrama 5. Efecto de la dosis de un elemento esencial sobre la respuesta biológica (Diagrama de Bertrand) (Baran 1995).

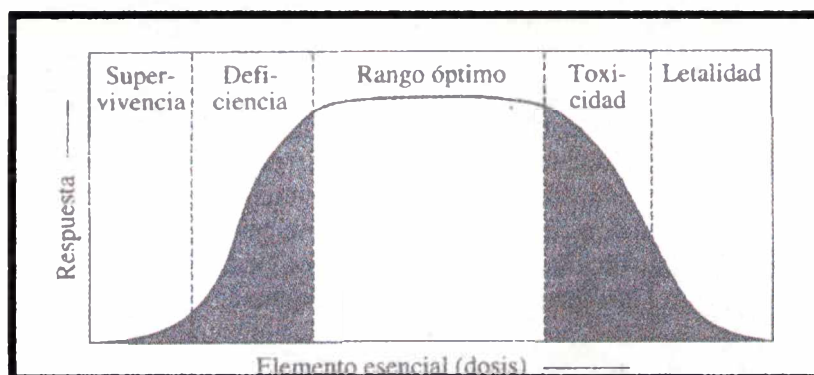
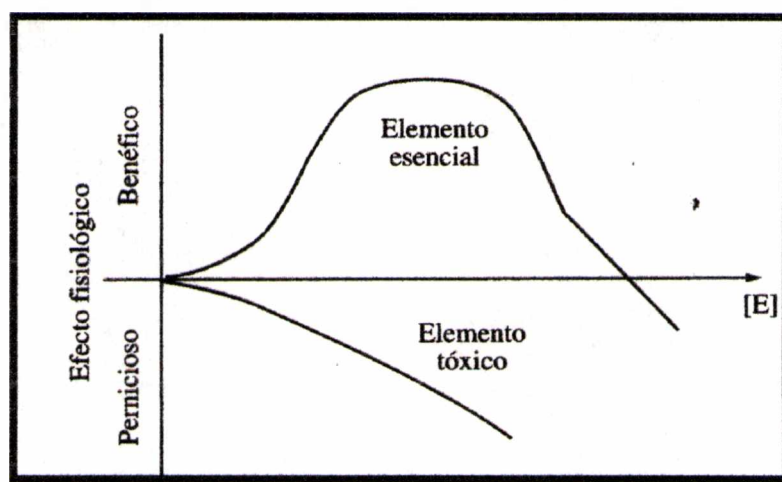


Diagrama 6. Comparación del efecto de la dosis de un elemento esencial y otro tóxico sobre la respuesta biológica (Baran 1995).



Para el caso del vanadio, pueden diagramarse curvas como las mostradas para los elementos esenciales. Sin embargo, si bien el vanadio es un elemento esencial para plantas y animales, aún no se considera un elemento esencial para el hombre. La esencialidad del vanadio fue sugerida por diferentes autores y hay un consenso de que es muy probable que así resulte (Nielsen 1990). En cabras sometidas a dietas libres de vanadio se observaron deformaciones de los huesos (Anke et al 1991). Sin embargo, la composición de estas dietas libres de vanadio no fue monitoreada con los actuales métodos analíticos de gran precisión para elementos traza. En formas inferiores de vida, como pueden ser los tunicados, algas marinas y bacterias el vanadio resulta también ser un elemento esencial. Además, fue sugerido como nutricionalmente importante para los mamíferos debido a que estimula la mineralización de los dientes (Cecchetti et al 1966) y la formación ósea (Nemsadze 1977). Hopkins y Mohr (Hopkins y Mohr 1974) propusieron que el vanadio se comportaría como un nutriente traza esencial. Sin embargo, los efectos observados se deberían a su acción farmacológica en animales alimentados con una dieta mal balanceada (Nielsen 1985), además no cumple con todos los criterios de esencialidad. Los signos más importantes, en torno a la esencialidad del vanadio, surgieron cuando a cabras se les administró una dieta balanceada y carente en vanadio. Los animales presentaron abortos espontáneos y las crías dolor en las extremidades y deformaciones óseas, entre las afecciones más importantes (Anke et al 1991).

Estudios en ratas mostraron que el vanadio tendría un papel fisiológico en el metabolismo del yodo y el funcionamiento de la tiroides (Uthus y Nielsen 1990). Los dos sitios más importantes, donde el vanadio tendría una función fisiológica en animales superiores, serían el metabolismo de la tiroides y el hueso (Nielsen 1995).

Todos estos hallazgos sugieren la esencialidad del vanadio, sin embargo aún no está claramente demostrado y aceptado. Uno de los criterios de esencialidad para un elemento es la presencia de un mecanismo homeostático para regular su contenido en el cuerpo, el cual no ha sido aún descrito para el vanadio, aunque se piensa que estaría regulado a través de la absorción, excreción y almacenamiento.

Si existe un requerimiento de vanadio en humanos, es muy pequeño. Hasta el momento no se ha definido ningún síndrome de deficiencia de este metal en humanos. El consumo diario de vanadio en la dieta se estima que va de 10 µg a 2 mg, dependiendo de los niveles ambientales que se encuentren en la región estudiada, algunos autores sugieren que esta cantidad podría ser propuesta como un requerimiento diario (Nielsen 1990). El hombre puede obtener el vanadio de los alimentos tales como carnes, leguminosas, cereales, hígado, pescado, espinacas, hongos, etc., en orden decreciente. Las cantidades de vanadio presentes en estos alimentos van desde 40 ng / g hasta 1 ng / g (Byrne y Kosta 1978).

Se estimó que no más del 1 % del vanadio ingerido normalmente con la dieta es absorbido. Una vez que el vanadio llega a la sangre, es transportado en su mayoría por la transferrina y la albúmina. Es rápidamente removido del plasma y retenido en diferentes tejidos. El vanadilo tiene poca capacidad para atravesar las membranas biológicas como catión libre (Heinz et al 1982), pero el vanadato ingresa a la célula a través de canales de fosfatos e iónicos no específicos; luego es reducido intracelularmente a vanadilo, principalmente por el glutatión (Cantley et al 1978; Robinson 1981; Heinz et al 1982; Nielsen 1990). El vanadato y el vanadilo forman rápidamente complejos con el glutatión, el citrato, las catecolaminas y proteínas como la albúmina y la transferrina, lo cual hace difícil y, en algunos casos, imposible conocer qué especie de vanadio es la responsable de los efectos (Chasteen et al 1986).

El hueso parece ser el mejor almacenador de vanadio seguido por el riñón y el hígado. Diferentes estudios muestran la misma afinidad del vanadio para acumularse en los tejidos, sin embargo el tipo de ligando modifica la relación, por ejemplo para el complejo BMOV la relación de acumulación en hueso : riñón : hígado es 8 : 3 : 2, mientras que para el VOSO_4 es

de 6 : 4 : 1 (Byrne y Kosta 1978; Yuen et al 1993; Setyawati et al 1998). La mayoría del vanadio ingerido de esta forma es excretado con las heces (Byrne y Kosta, 1978). Sin embargo, cuando el vanadio es administrado intravenosamente a ratas, 96 horas después un 30 a 40 % es excretado en orina y un 9 a 10 % en las heces (Hopkins y Tilton 1966; Nielsen 1995).

2.4. Acciones farmacológicas del vanadio *in vivo*.

2.4.1. Estudios en animales de experimentación.

El interés biológico del vanadio resurgió al encontrar que inhibía la Na^+ / K^+ ATPasa, posteriormente se comenzaron los estudios en cultivos celulares encontrando diferentes acciones biológicas y farmacológicas. Una de ellas, y tal vez la mas interesante, fue su actividad insulinomimética y, que paradójicamente, no es consecuencia de la inhibición de la Na^+ / K^+ ATPasa, sino probablemente de la inhibición de las PTPasas. Los primeros reportes de su actividad insulinomimética, en animales, fueron realizados por Heyliger (Heyliger et al 1985). Sin embargo, ya en 1958, se habían descripto algunos efectos metabólicos del vanadio en animales de experimentación, pero no tuvieron gran repercusión. Estos estudios mostraron que la biosíntesis hepática de colesterol, ácidos grasos y fosfolípidos, en ratas, son inhibidas por el sulfato de vanadilo *in vitro* e *in vivo* (Snyder y Cornatzer 1958).

Para estudiar los efectos insulinomiméticos del vanadio se utilizan modelos de ratas con algún grado de deficiencia insulínica o genéticamente diabéticas. El modelo de ratas diabéticas más usado y simple es inducido con estreptozotocina (STZ, por *Streptozotocin*) (Bell y Hye 1983). La STZ es un antibiótico que específicamente afecta las células β secretoras de insulina en el páncreas. El modelo de rata diabética por STZ se obtiene por administración intravenosa de la droga, usualmente en dosis de 45 a 75 mg / kg de peso corporal. De esta forma, se reduce la capacidad de secreción de insulina y se observa un aumento en la glucemia y la glucosuria. Las ratas tratadas con STZ se tornan insulinopénicas, hiperfágicas y catabólicas. El modelo no es completamente paralelo a la diabetes de tipo 1 en humanos y las ratas pueden sobrevivir sin la administración de insulina, sin embargo la necesitan para el control adecuado de la glucemia.

Los trabajos con animales diabéticos por estreptozotocina mostraron que 0,5 mg / ml de vanadato, en el agua de bebida, durante 6 semanas, causó la normalización de la glucemia en estas ratas (Heylieger, 1985). Otro estudio con el mismo modelo de ratas, mostró que el metavanadato de sodio, administrado oralmente (0,8 y 0,2 mg / ml) redujo los niveles elevados de glucosa plasmática, sin provocar hipoglucemia. Las ratas que recibieron 0,2 mg / ml de vanadato alcanzaron una concentración plasmática de 0,8 µg / ml de vanadio a las 3 semanas. Con el objetivo de estudiar qué mecanismos estarían involucrados en el efecto hipoglucemiante se aislaron células de tejido adiposo, músculo e hígado de ratas tratadas con STZ y vanadato. Se observó en los adipocitos un aumento en la respuesta a insulina, en los hepatocitos una mayor unión de la insulina al receptor y un aumento en la captación de glucosa en células de músculo e hígado (Meyerovitch et al 1987). Además, se encontró que en el hígado de ratas diabéticas por STZ, el vanadato restaura los niveles de ARNm de enzimas glicolíticas y el glucógeno hepático (Badmaev et al, 1999).

Ratones genéticamente obesos, denominados ob / ob, caracterizados por presentar insulinoresistencia e hiperglucemia, fueron tratados oralmente con dosis de 0,3 mg / ml de vanadato por 7 semanas. Se observó una disminución de la glucemia, una mejora en la prueba de tolerancia a la glucosa y además la inducción de un pico temprano de insulina (Brichard et al 1990). En este mismo modelo, la administración por tres semanas en el agua de bebida de 0.25 mg / ml de vanadato de sodio produjo una disminución de la glucosa plasmática de 236 a 143 mg / dl. Se estudió la posible activación del IR por vanadato, demostrándose que los efectos insulinomiméticos observados no estarían mediados por el IR (Meyerovitch 1991). Por otro lado, Brichard (Brichard et al, 1990) encontró que el efecto insulinomimético del vanadio podría deberse a un aumento en la producción de glucógeno en el hígado y una mejoría en la respuesta de los tejidos periféricos a la insulina. Además, sugirió también que el vanadio podría inducir un aumento en la insulina circulante.

En ratones genéticamente diabéticos, denominados db / db, caracterizados por presentar obesidad, hiperglucemia e hiperinsulinemia, el vanadato normalizó la glucemia e indujo una significativa disminución del peso corporal e insulina circulante. Además, normalizó la actividad de enzimas como la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, relacionada con el metabolismo de la glucosa, parámetro que no modificó en ratas no diabéticas (Pugazhenth et al 1991a).

En otro modelo de ratas, a las cuales se le extrajo parcialmente el páncreas, el vanadato normalizó la incorporación de glucosa a los tejidos y la síntesis de glucógeno. De esta forma,

se ha demostrado que el vanadato es un agente efectivo para normalizar la glucemia de diferentes modelos de ratas diabéticas. Sin embargo, el vanadio(V) es un agente más tóxico que el vanadio(IV) *in vivo* e *in vitro* (Sabbioni et al 1991; Nakai et al 1995). Es por ello, que se han llevado a cabo estudios para determinar los efectos insulinomiméticos del vanadio(IV).

A ratas normales y tratadas con STZ se les administró sulfato de vanadilo durante un año en el agua de bebida en concentraciones de 0,5 y 1,5 mg / ml. El tratamiento redujo la incidencia de cataratas y la mortalidad de los animales diabéticos; mejoró la hiperglucemia y los lípidos plasmáticos, además, redujo el consumo de líquidos y alimentos. Se encontró que el vanadilo no alteró la función hepática y renal de los animales ya que no hubo cambios en aminotransferasas y urea plasmática. Tampoco se observaron alteraciones morfológicas en diferentes órganos, ni la modificación del peso corporal para ambos grupos de ratas. Este estudio muestra que el vanadilo, en dosis terapéuticas, no produce efectos tóxicos importantes (Dai y McNeill 1994; Dai et al 1994a,b).

A ratas tratadas con STZ se les administró intraperitonealmente (i.p.) vanadilo en dosis de 9,3 y 4,6 mg de vanadio / kg de peso corporal. El tratamiento produjo una disminución de la glucemia de 800 a 250 mg / dl, sin afectar los niveles de insulina plasmática. También se encontró que el vanadilo aumenta la incorporación de glucosa en los adipocitos de estas ratas, proponiéndose que el efecto del vanadilo sería sobre los tejidos periféricos. El vanadio acumulado en los órganos se encontró presente como vanadio(IV). Esto sugiere que tanto el vanadato como el vanadilo tienen actividad insulinomimética *in vivo* y que la especie farmacológicamente activa podría ser el vanadilo (Sakurai et al 1990).

En ratas tratadas con altas dosis de STZ se estudió el efecto del vanadilo sobre la glucemia con y sin la administración de insulina exógena. Estas ratas desarrollan un modelo de diabetes severa que presenta bajos niveles de insulina circulante, menores al 25 % del valor normal. El tratamiento con vanadilo se realizó después de que las ratas mostraran un déficit importante de insulina. En este modelo, el vanadilo disminuyó los valores de glucosa plasmática de 520 a 420 mg / dl, pero no se logró normalizar la glucemia de estos animales. Sin embargo, cuando se les administró vanadilo e insulina se logró una normalización de la glucemia con menores requerimientos de la hormona que los observados para animales tratados sólo con insulina (Dehghani et al 1997). Utilizando este tipo de modelos de ratas diabéticas con STZ, estos investigadores muestran que el vanadio sería efectivo para el tratamiento de la Diabetes de tipo 2.

En ratas tratadas con STZ se realizó un estudio de administración de vanadilo durante trece semanas. El vanadilo administrado oralmente durante las tres primeras semanas, normalizó la glucemia de las ratas durante todo el estudio, inclusive después de la suspensión del tratamiento. Esto sugiere un efecto normoglucemiante residual y protector de los islotes del páncreas en ratas tratadas con STZ (Pederson et al 1989). En otro estudio, se encontró que el vanadato estimuló levemente la secreción de insulina de las células β pancreáticas (Fagin et al, 1987). Además, un trabajo realizado por Poucheret y colaboradores (Poucheret et al 1995), demostró que el tratamiento con sulfato de vanadilo tiene efectos beneficiosos sobre la función de las células β del páncreas en animales tratados con STZ. Los resultados encontrados por Pederson y Pouruchet (Pederson et al 1989; Pouruchet 1995) sugieren que el vanadilo, además de mejorar la respuesta de los tejidos periféricos y estimular la síntesis de glucógeno, tendría un efecto secretagogo de insulina y protector de las células β , en ratas diabéticas por STZ. Por otra parte, dado que en algunos experimentos se había observado un efecto remanente del vanadilo, se trataron ratas diabéticas con STZ por tres semanas y luego se suprimió el tratamiento. Las concentraciones plasmáticas de glucosa, insulina y lípidos retornaron a los valores previos al tratamiento después de 13 semanas (Ramanadham 1989). Estos datos muestran que el vanadilo tendría efectos insulinomiméticos remanentes y se sugiere que serían debidos a una acumulación del vanadio en los tejidos, los cuales actuarían como reservorio. Además, los resultados sugieren que sería necesario rediseñar las estrategias utilizadas para la terapéutica de la Diabetes mellitus con vanadio.

2.4.2. Estudios en humanos.

A partir de 1995 se realizaron ensayos en humanos para determinar la seguridad y eficacia de las sales de vanadio como potenciales drogas para el tratamiento de la Diabetes mellitus (Cohen et al 1995, Goldfine et al 1995a, Halberstam et al 1996, Boden et al 1996, Cusi et al, 2001).

Un grupo de pacientes con diabetes de tipo 1 y 2 fue tratado con metavanadato de sodio (50 mg / día de vanadio). El ensayo duró cuatro semanas, incluyendo en este período una semana previa y una posterior sin la administración de metavanadato. La administración de vanadato no mejoró el metabolismo de glucosa en los pacientes con Diabetes de tipo 1. Sin embargo, en los pacientes con Diabetes de tipo 2 se observó un aumento del metabolismo no oxidativo de

la glucosa. El metavanadato de sodio no tuvo efecto sobre la producción hepática de glucosa, pero sí sobre la utilización de la glucosa dependiente de insulina. Los autores sugieren que el aumento en la utilización de la glucosa no está relacionado con el hígado, sino que se debería a un incremento en la sensibilidad de los tejidos periféricos a la insulina. Además, se observó una disminución importante en los requerimientos de insulina para los pacientes con Diabetes de tipo 1. El colesterol plasmático disminuyó en ambos grupos de pacientes y los efectos colaterales más comunes de este tratamiento fueron pequeñas molestias gastrointestinales (Goldfine et al 1995).

También se llevaron a cabo diferentes estudios en pacientes diabéticos con sulfato de vanadilo, una droga utilizada en medicina deportiva en preparaciones con taurina, para determinar su eficacia y seguridad en el tratamiento de enfermedades como la Diabetes mellitus. Pacientes con Diabetes de tipo 2 se trataron con 100 mg / día de sulfato de vanadilo (aprox 33 mg de vanadio). A diferencia del estudio con metavanadato de sodio, los pacientes mejoraron la respuesta hepática a la insulina, efecto que se mantuvo por dos semanas posteriores a la finalización del tratamiento. Esta acción remanente podría estar relacionada con el contenido de vanadio encontrado en las dos semanas posteriores a la suspensión de la administración de vanadilo (Cohen et al 1995).

Ocho pacientes con Diabetes mellitus de tipo 2 recibieron dos dosis de 50 mg / día de sulfato de vanadilo por 4 semanas. El vanadilo produjo un 20 % de disminución de la concentración de glucosa plasmática en ayunas y redujo la producción hepática de glucosa. Se reportaron problemas gástricos en seis pacientes durante la primer semana, sin embargo, el tratamiento fue bien tolerado en las semanas siguientes (Boden et al. 1996).

Pacientes moderadamente obesos con Diabetes de tipo 2, y sujetos no diabéticos fueron tratados también con sulfato de vanadilo. Se encontró una disminución de la glucosa plasmática en ayunas y de la hemoglobina glicosilada en los pacientes diabéticos, mientras que no se observaron cambios de estos parámetros en los pacientes normales. En las personas diabéticas se encontró un aumento en la sensibilidad de los tejidos periféricos a la insulina y una disminución de los ácidos grasos libres en el plasma (Halberstam et al. 1996).

Para determinar qué dosis de vanadio podrían ser terapéuticamente adecuadas se realizó un estudio en el cual se administró tres veces por día 25, 50 y 100 mg de sulfato de vanadilo trihidrato a pacientes con Diabetes de tipo 2 durante seis semanas. Dosis de 25 mg no produjeron cambios en el metabolismo de la glucosa ni de los lípidos. Las concentraciones

plasmáticas de vanadio llegaron a 16,0 $\mu\text{g} / \text{L}$. Los pacientes tratados con 50 y 100 mg mostraron un aumento en la sensibilidad de los tejidos a la insulina. Los niveles plasmáticos de vanadio fueron cinco veces superiores a los encontrados cuando se administraron 25 mg / día. El metabolismo no oxidativo de la glucosa parece ser más afectado que el oxidativo por el vanadilo (Goldfme et al 1998).

El último estudio clínico realizado por Cusi y colaboradores, en Argentina, muestra resultados más alentadores que los anteriores (Cusi et al, 2001). Se estudiaron 11 pacientes con diabetes de tipo 2 a los cuales se les administró sulfato de vanadilo (150 mg / día) durante 6 semanas. El tratamiento disminuyó la glucosa plasmática en ayunas de 194 a 155 mg / dl. Además, la hemoglobina glicosilada y la fructosamina también disminuyeron significativamente, no observándose cambios en el peso corporal. El sulfato de vanadilo redujo la producción endógena de glucosa en un 20 % y correlacionó con la disminución de la glucosa plasmática en ayunas. El vanadilo también mejoró la utilización de glucosa dependiente de insulina, sin embargo el aumento de la respuesta a la insulina no correlacionó con la disminución de la glucosa plasmática en ayunas. Por otro lado, el tratamiento disminuyó el colesterol total y el colesterol LDL. Los autores sugieren que el sulfato de vanadilo en dosis tolerables mejora la sensibilidad del hígado y el músculo a la insulina en pacientes con Diabetes mellitus de tipo 2. La disminución en la glucemia se correlacionó con la disminución de la glucosa plasmática, determinada en ayunas, y no con la utilización de glucosa dependiente de insulina, sugiriendo que el hígado es más sensible que el músculo a la acción del sulfato de vanadilo, en concentraciones terapéuticas para pacientes con Diabetes de tipo 2.

Se puede concluir que existe considerable evidencia de que el vanadio puede mimetizar algunos de los efectos de la insulina en diferentes sistemas celulares y es capaz de normalizar la glucemia en modelos de ratas diabéticas. Estudios clínicos en humanos muestran que las sales de vanadio, en dosis de 150 mg / día, durante seis semanas, parecen ser seguras y relativamente bien toleradas por los pacientes. Los estudios no mostraron cambios hematológicos o estrés oxidativo en los tejidos, sin embargo se reportaron malestares gastrointestinales que limitaron las dosis de vanadio a ser administradas. El incremento de las dosis a lo largo del tratamiento mostró una mejor tolerancia. En la mayoría de los pacientes con Diabetes de tipo 2, tratados con vanadilo, se observó un aumento en la sensibilidad de los tejidos a la insulina, estimulando principalmente el metabolismo no oxidativo de la glucosa. Además, se pudo establecer que una dosis de 150 mg / día es eficaz para el tratamiento de la Diabetes de tipo 2. Los resultados reportados *in vivo*, en humanos, sugieren que el efecto

normoglucemiante del vanadio es insulín dependiente, actuando como un potenciador de la insulina. Por otro lado, sería necesario hacer estudios a largo plazo ya que los pacientes diabéticos requieren de una terapia de por vida.

Otro aspecto importante de los compuestos de vanadio es su habilidad para inhibir PTPasas. Se propone que éste sería el principal mecanismo de acción a escala molecular, que mediaría los efectos insulínomiméticos de esos compuestos. Las PTPasas activan o inhiben señales que desencadenan diferentes efectos biológicos. *In vivo*, el contenido de proteínas fosforiladas es un equilibrio dinámico entre la actividad de las quinasas y las fosfatasas, mostrando que ambas tienen un papel preponderante en la regulación de procesos celulares. La fosforilación de proteínas en restos de tirosina es el principal mecanismo de iniciación y propagación de la acción de la insulina. La finalización de la respuesta está regulada por diferentes PTPasas, entre ellas las de mayor relevancia son: PTP-1B y LAR. Además, la actividad de estas enzimas se encontró aumentada en diferentes pacientes obesos con insulínorresistencia (Ahmad et al 1997).

La fosfatasa PTP-1B se expresa en diferentes tejidos y, fundamentalmente, en aquellos que son sensibles a la insulina. Se localiza principalmente en el retículo endoplásmico (**RE**) y en el citosol. Estudios recientes en ratones *knockout* para PTP1B sugieren que ejerce una regulación negativa en distintos sitios de la vía de señalización utilizada por la insulina. Estos ratones deficientes en PTP-1B muestran una mayor sensibilidad a la insulina, un aumento en el metabolismo de la glucosa y una disminución de la obesidad debida a alimentos ricos en grasas. Además, se encontró un aumento importante en la fosforilación del IR en el hígado y el músculo. Por otro lado, la sobreexpresión de PTP-1B reduce algunos de los efectos de la insulina. Estos resultados sugieren que PTP-1B es un buen blanco de acción del vanadio y podría estar mediando algunos de los efectos del vanadio antes mencionados (Cheng et al 2002; Radike et al 2002).

LAR es un receptor con actividad PTPasa, su localización en la membrana plasmática es próxima al IR, transformándolo a este último en un sustrato importante para LAR. La sobreexpresión de LAR disminuyó los niveles de fosforilación de IR, IRS-1 y PI3-K. Ratones *knockout* para LAR mostraron que no estaría relacionado con las señales intracelulares de la insulina. LAR estaría asociado con el desarrollo de la glándula mamaria y no con la regulación de las señales de la insulina. Sin embargo, se ha encontrado que en pacientes con insulínorresistencia se encuentra elevada la actividad de LAR, asociándolo con este tipo de patología (Cheng et al, 2002; Radike et al, 2002). Por lo tanto, la inhibición de LAR por el

vanadio podría ser un mecanismo de acción insulinoimético para pacientes con Diabetes de tipo 2 que muestren elevada la actividad de LAR.

2.5. Toxicidad.

La toxicidad del vanadio es un punto muy importante si estamos interesados en su uso como potencial agente terapéutico y principalmente si va a ser utilizado en tratamientos crónicos. Fueron descriptos diferentes efectos tóxicos del vanadio debido a la inhalación de emanaciones industriales en forma de V_2O_5 (Thompson 1998).

En estudios realizados en otros laboratorios, con el objetivo de evaluar la toxicidad aguda y crónica del vanadio en animales, se administraron diferentes dosis de vanadio a ratas. La administración en el agua de bebida de 0,2 a 1 mg / ml de sulfato de vanadilo o vanadato de sodio causó neurotoxicidad, nefrotoxicidad y desórdenes gástricos, entre los efectos tóxicos más importantes (Domingo et al 1995). La acumulación de vanadio en los riñones afectó su función, modificando la retención de agua y solutos, este efecto estaría asociado con la inhibición de la Na^+/K^+ ATPasa del riñón (Phillips et al. 1983). La administración intraperitoneal de vanadato a ratas, en dosis de 1,5 mg / kg, durante 12 días, produjo un incremento de la peroxidación lipídica y disminución de los grupos sulfhidrilos no protéicos en células neuronales (Haider et al 1998). Esta actividad prooxidante del vanadio puede posiblemente producir la irritación local de las membranas de la mucosa, causando problemas gastrointestinales en los pacientes tratados con vanadio (Cohen et al 1995). Estos efectos se deberían principalmente a su actividad prooxidante (Djordjevic y Wampler 1985). Hay evidencia de que el vanadio causaría mutagénesis, genotoxicidad, carcinogénesis y daño en el ADN en células en cultivo (Sabbioni et al 1993; Ciranni et al 1995; Domingo 1996; Shi et al 1996a; Shi et al 1996b). Estudios de toxicidad aguda de vanadio en roedores mostró que tanto el vanadilo, como el vanadato, son tóxicos en dosis superiores a las utilizadas como agente terapéutico, sin embargo el vanadato es más tóxico que el vanadilo. Por ejemplo, la DL_{50} del sulfato de vanadilo pentahidrato en ratas es de 448 mg / kg, mientras que la DL_{50} para el metavanadato de sodio, en las mismas condiciones, es de 98 mg / kg. Los animales estudiados mostraron diarrea, respiración irregular y síntomas neurológicos (Llobet y Domingo 1984).

Estudios crónicos de toxicidad en ratas normales con metavanadato de sodio (5, 10 y 50 ppm) mostraron que no se afectó la apariencia física, el comportamiento o el consumo de agua y

alimentos. Sin embargo, se observaron cambios histopatológicos en riñones y bazo (Domingo et al 1985). Se observó que 0,4 mg / ml en el agua de bebida indujo una disminución de la producción de esperma en ratas. Además, se han descrito importantes efectos tóxicos en embriones de ratas y ratones (Leonard y Gerber 1994; Domingo et al 1995). Esto tiene importantes implicancias clínicas y por lo tanto los compuestos de vanadio no deberían ser considerados para usar durante la concepción, el embarazo o la lactancia.

Un aspecto adicional es la acumulación de vanadio en los tejidos y la toxicidad a largo plazo. El vanadio se acumula mayoritariamente en hueso, riñón e hígado. Presumiblemente, algún equilibrio es alcanzado en la mayoría de los tejidos blandos que no acumulan vanadio, sin embargo su similitud con el fosfato podría favorecer la acumulación en el hueso. La relevancia clínica de este punto también debería ser considerada.

Como se mencionó anteriormente todos los elementos de transición y, principalmente los esenciales, pueden ser tóxicos en dosis no adecuadas. Estudios en pollos mostraron que, dosis de 12,5 y 25 ppm de vanadio por día, no afectaron la producción de huevos ni el peso corporal, pero cantidades superiores a 100 ppm produjeron la reducción de ambos parámetros, así como también la muerte de algunos animales (Kubena y Phillips 1983).

En otro estudio donde se evaluó la embriotoxicidad, fetotoxicidad y teratogenicidad del vanadio en ratones Swiss albinos se estableció que dosis de 37,5 mg / kg / día de sulfato de vanadilo no presentaron efectos tóxicos observables (Paternain et al 1990). La dosis adecuada para el vanadato sería de 15 mg / kg / día (Sanchez et al 1991). Por otro lado, la dosis tóxica para las cabras estaría en el rango de 400 a 600 mg / kg / día. Como puede advertirse, el índice terapéutico del vanadio depende, en gran medida, de la especie animal y el estado de oxidación del metal. Confirmando lo antes mencionado, en humanos, el rango potencial de uso estaría entre 0,0007 a 2 mg / kg / día, cuarenta veces menos que la dosis requerida para las ratas (McNeill et al 1992).

Estudios en humanos mostraron diferentes efectos colaterales, tales como síntomas gastrointestinales, coloración verdosa de la lengua e intolerancia, entre los más destacados (Cohen et al 1995; Goldfine et al 1995a; Boden et al 1996; Halberstam et al 1996). Todos estos investigadores manifestaron que sería necesario una mejor revisión de los efectos tóxicos en largos períodos de tiempo. En particular, teniendo en cuenta que el esqueleto es uno de los principales sitios de acumulación de vanadio en vertebrados, en este trabajo de tesis se consideran los efectos citotóxicos de derivados de vanadio(IV) en osteoblastos en cultivo.

2.6. Importancia de la complejación del vanadio.

Dado que los compuestos inorgánicos de vanadio son pobremente absorbidos por el intestino y que causan trastornos gastrointestinales, diferentes laboratorios han sintetizado complejos de vanadio con ligandos orgánicos para tratar de subsanar estos aspectos. La coordinación de especies inorgánicas de vanadio podría aumentar la solubilidad, estabilidad y absorción del vanadio y, por lo tanto, disminuir los problemas gastrointestinales asociados con las dosis elevadas o los tratamientos prolongados. Además, esta modificación estructural podría incrementar la potencia farmacológica de los mismos, disminuir su toxicidad y los requerimientos de vanadio para el tratamiento de diversas afecciones (Yuen et al 1993; McNeill et al 1995, Thompson et al 1999).

Uno de los complejos de vanadilo más estudiado es el derivado de maltol bis(Maltolato)oxovanadio(IV) (**BMOV**). El mismo, fue desarrollado para aumentar la absorción gastrointestinal del vanadio y por consiguiente reducir las dosis diarias que logran normalizar la glucemia de animales diabéticos. La administración oral de BMOV en el agua de bebida a ratas diabéticas por la administración de STZ logró normalizar la glucemia de estos animales. Las dosis necesarias de sulfato de vanadilo para obtener la normalización de la glucemia fueron el doble de las requeridas para BMOV. Durante las 25 semanas que duró el ensayo no se detectaron signos de toxicidad. Por otro lado, la administración oral de BMOV aumentó significativamente la absorción gastrointestinal de vanadio y modificó su afinidad y retención por los diferentes tejidos (Yuen et al 1993; McNeill et al 1995; Thompson et al 1999). Estas experiencias, entre otras, muestran la relevancia que tiene la complejación del vanadilo para mejorar su biodisponibilidad y sus efectos farmacológicos.

2.7 El vanadio en el hueso.

La importancia del vanadio en el hueso surge de estudios realizados para tratar de establecer la esencialidad de este elemento y de su relación con el metabolismo de la tiroides y con la formación del esqueleto (Uthus y Nielsen 1990; Nielsen 1995). Anke y colaboradores (Anke et al 1990) encontraron deficiencias óseas en cabras que habían sido alimentadas con dietas pobres en vanadio.

Por otro lado, estudios sobre la absorción, metabolismo y excreción de vanadio mostraron una acumulación preferencial en hueso, riñón e hígado (Setyawati et al 1998). La acumulación de vanadio en el hueso puede deberse a su analogía con el fosfato, sustituyéndolo en los cristales de hidroxiapatita (Etcheverry et al 1984; Narda et al 1992). Se cree que la gran cantidad de vanadio en el riñón se debe a que éste es excretado por la orina (Hopkins y Tilton 1966; Nielsen 1995). La presencia de vanadio en el hígado y el bazo parece estar asociada a que el vanadio se une a en gran medida a la ferritina y transferrina, proteínas almacenadoras y transportadoras de hierro, respectivamente (Chasteen et al 1986).

Diferentes estudios muestran la acumulación de vanadio en el hueso (10 - 26 $\mu\text{g} / \text{g}$) (Mongold et al 1990; Ramanadham 1991; Yuen et al 1993; Dai 1994; Setyawati et al 1998). Estas cantidades son el doble de las encontradas en el riñón y 10 veces más altas que las encontradas en el hígado. Con el objetivo de estudiar los efectos del vanadio en el hueso se trataron ratas Zucker obesas y diabéticas con BMOV (0,8 mg / ml) examinándose luego la tibia y las vértebras de los animales (Pouruchet et al 1998). El tratamiento mejoró los síntomas de la Diabetes mellitus. El contenido de vanadio en los huesos de las ratas tratadas fue de 9,4 $\mu\text{g} / \text{g}$ para la tibia y de 6,6 $\mu\text{g} / \text{g}$ para las vértebras. El vanadio no alteró el contenido de otros minerales (K, Mg, Na, Ca y P) ni la estructura del hueso como pudo determinarse por difracción de rayos X; además tampoco se afectaron las propiedades mecánicas del hueso. Por lo tanto, la arquitectura, densidad y propiedades mecánicas del hueso no fueron modificadas por el tratamiento con vanadio en las dosis que poseen efectos insulínimiméticos (Pouruchet et al 1998).

Estudios realizados con células fibroblásticas muestran que el vanadio estimula la síntesis de ADN y colágeno, sugiriendo que es un inductor de la proliferación y diferenciación osteoblastica (Canalis 1985; Lau et al 1988). Además, el vanadio se comporta como factor de crecimiento mimetizando al EGF, FGF y la insulina, promoviendo la formación y reparación ósea (Nemsadze 1977; Kato 1987; Lau 1988). Por otro lado, la fosfatasa alcalina ósea está indirectamente implicada en el proceso de mineralización del hueso. La FAL está presente en la membrana plasmática de los osteoblastos y aumenta la concentración de fosfato inorgánico (Pi) en las zonas de mineralización, favoreciendo la precipitación de fosfato de calcio, necesario para la mineralización ósea. Se ha descrito que el vanadio es un inhibidor de la FAL, entre ellas la ósea (Cortizo et al 1995). De lo expresado anteriormente se observa que la formación de mineral óseo es un proceso complejo que depende tanto de la formación de una matriz extracelular como de la precipitación de cristales de hidroxiapatita.

3. FISIOLÓGÍA DE LOS OSTEÓBLASTOS

La mineralización del esqueleto es un proceso complejo que ocurre a través de la formación (mediada por los osteoblastos) reformación y resorción (mediada por los osteoblastos y osteoclastos). Los osteoblastos se originan de células mesenquimatosas o células progenitoras osteogénicas que poseen propiedades características de las células germinales, tales como el potencial de auto-replicación y la capacidad de diferenciación. La transformación de células preosteoblásticas en osteoblastos activos, transcurre en una serie de etapas: (1) proliferación de las células precursoras, (2) diferenciación en osteoblastos maduros que producen una matriz extracelular y (3) mineralización de la misma.

Los osteoblastos son responsables de la síntesis y secreción de proteínas de matriz extracelular que servirá como base para la formación del hueso. Las células osteoblásticas se disponen formando una lámina o monocapa sobre la superficie de formación ósea y se comunican por uniones tipo *gap*. Los osteoblastos sintetizan grandes cantidades de colágeno tipo I y fosfatasa alcalina. Algunas proteínas, como el factor de transcripción Cbfa-1 y la osteocalcina son producidas exclusivamente por los osteoblastos. Otras, como la osteopontina, son secretadas también por estas células y otros tipos celulares. Luego de formar la matriz extracelular los osteoblastos pueden quedar atrapados por el material intercelular para formar osteocitos, morir por apoptosis o convertirse en células aplanadas de revestimiento. Estas últimas son importantes en la regulación de la resorción ósea mediada por diferentes factores locales, incluyendo citoquinas, prostaglandinas y factores de crecimiento.

3.1. Factores de crecimiento producidos por osteoblastos.

Se ha demostrado que el hueso es un reservorio importante de factores de crecimiento (**GF**) y proteínas relacionadas con el desarrollo óseo. Los factores de crecimiento pueden actuar localmente para modular la formación del hueso estimulando la proliferación y diferenciación de los osteoblastos. Se han descrito diferentes factores de crecimiento sintetizados y acumulados por los osteoblastos en la MEC, y ellos son: IGF-I y -II, TGFβ1 y 2, FGF ácido y básico, PDGF, y las BMPs (Mohan y Baylink 1991; Baylink et al 1993).

Los factores de crecimiento similares a insulina (**IGFs**) pertenecen a un grupo de péptidos que juegan un papel muy importante en el crecimiento y desarrollo del hueso, entre otros tejidos. Los IGFs son los más abundantes GF sintetizados y acumulados por el hueso (Tharaikill et al 1995). Se sugiere que el IGF-I es el que actúa como mediador de las acciones promotoras del crecimiento de la hormona de crecimiento (**GH**, por **G**rowth **H**ormone). Sin embargo, los IGF son también sintetizados localmente en diferentes tejidos y actúan autócrina y parácrinamente en el metabolismo del hueso. La acción de los IGFs está modulada por receptores de tipo I y II, proteínas ligadoras de IGFs (**IGFBPs**) y proteasas para las IGFBPs. El receptor de tipo I, similar al de insulina, posee actividad tirosina quinasa y fosforila el sustrato del receptor de insulina. El receptor de tipo II, a diferencia del de tipo I, es un monómero y no posee actividad tirosina quinasa, activa proteínas G y de esta manera incrementa el influjo de Ca^{2+} , generando IP3 y DAG. Los efectos de los IGFs son variados y los osteoblastos poseen un requerimiento absoluto de IGF-I para su crecimiento. El agregado de IGF exógeno estimula la replicación de osteoblastos en cultivo (Hock et al 1988), influye en la diferenciación (Pfeilschifter et al 1990) y estimula la formación ósea in vivo (Moeller y Cortesi 1992). La activación de los receptores para IGF-I estimula las vías de las MAPK y de la PI3-K, sirviendo como una señal para el crecimiento y diferenciación celular.

El TGF- β 1 pertenece al sistema del factor de crecimiento tumoral β (**TGF- β**) el que se expresa en mayor cantidad en el hueso. Este GF produce diferentes efectos dependiendo del tipo celular estudiado, por ejemplo, inhibe la proliferación y diferenciación de los osteoblastos MC3T3E1 (Noda y Rodan 1986), sin embargo, estimula el crecimiento y la síntesis de proteínas óseas en células de calvaria de rata, además, estimula la FAL en un osteosarcoma de rata (Pfeilschifter et al 1987). El balance entre la formación y la resorción ósea está modulado aparentemente por TGF- β , cuya síntesis en osteoblastos es estimulada por los efectos anabólicos de la PTH y de la vitamina D₃.

3.2. Modelos de células de tipo osteoblasto murino.

Las células en cultivo proveen un modelo simple en el cual se pueden estudiar diversos fenómenos biológicos. La línea de células **MC3T3-E1**, derivadas de calvaria de ratón, es un modelo de preosteoblastos que pueden diferenciarse a lo largo del cultivo celular en osteoblastos que alcanzan diferentes estadios de maduración. Además, provee un sistema

adecuado para examinar los procesos de formación de la matriz extracelular y las respuestas a diferentes hormonas, fármacos y metabolitos durante el desarrollo y la formación ósea. Esta línea de células, en su fase proliferativa, tiene una morfología fibroblástica y crece en monocapas, tienen la capacidad de diferenciarse a osteoblastos que expresan diferentes marcadores específicos y de mineralizar la matriz extracelular formando una hidroxapatita madura *in vitro* (Sudo et al 1983). Durante la fase inicial de crecimiento, 1 a 9 días de cultivo, las células MC3T3-E1 sintetizan ADN e incrementan su número, mostrando una replicación activa y manteniendo una apariencia fusiforme; no expresan FAL ni acumulan matriz extracelular, consistentes con un osteoblasto inmaduro. Luego de 10 días de cultivo, comienzan a tornarse cuboides, alcanzan la confluencia, y experimentan un arresto en el crecimiento. La regulación negativa de la replicación celular esta asociada con la expresión de las funciones osteoblásticas específicas. La diferenciación a osteoblastos comienza a detectarse a las dos semanas de cultivo, se expresan proteínas relacionadas con el fenotipo osteoblástico maduro, incluyendo la producción de FAL, procesamiento del procolágeno y acumulación de colágeno en la matriz extracelular. La mineralización de la matriz extracelular (relacionada con la expresión de osteocalcina y acumulación de calcio) comienza aproximadamente el día 16, marcando el final de la fase del desarrollo del fenotipo osteoblástico alrededor del día 30 de cultivo cuando comienzan a morir por apoptosis (Quarles et al 1992).

La etapa proliferativa de las células MC3T3-E1 es estimulada autócrina y parácrinamente por diferentes agentes específicos e inespecíficos. Se ha descrito que esta línea celular secreta y acumula, en la MEC, diferentes factores que regulan y estimulan el crecimiento (IGF-I, II, TGF β 1 y IGFBP-2, -4, -5 y -6) (Amarnani et al 1993; Tremollieres et al 1994; Thraillkill et al 1995). Cuando a las células MC3T3-E1 se les agrega exógenamente IGF-I y II, FGF, PDGF e insulina responden con un aumento en la proliferación celular (Amarnani et al 1993, Tremollieres et al 1994, Martelli et al 2000). Esta línea de células posee receptores para los factores de crecimiento y éstos se caracterizan por tener actividad tirosina quinasa y desencadenar cascadas de transducción de señales fosforilando diferentes proteínas. El efecto mitogénico estaría mediado, fundamentalmente, por dos vías de transducción de señales las ERKs y la PI3-K. Las ERKs activan diferentes factores de transcripción que desencadenan un aumento en la proliferación (Cobb 1999), mientras que la vía de la PI3-K activa a PKB la cual se dirige al núcleo y sería la responsable del efecto mitogénico mediado por esta vía (Borgatti et al 2000). La hormona de crecimiento es sintetizada y acumulada por células somatotrofas,

regula la expresión del IGF-I, las IGFBPs y estimula el crecimiento de los huesos, entre otros efectos. En las células MC3T3-E1, la GH incrementa la síntesis de ADN, probablemente a través de la estimulación de los osteoblastos a producir y secretar IGF-I (Chihara y Sugimoto 1997). Las catecolaminas son otro grupo de mitógenos para las células MC3T3-E1, ellas actuarían a través del receptor- α adrenérgico asociado a proteínas G, además, el efecto mitogénico es suprimido por genisteína, un inhibidor no selectivo de quinasas de tirosinas, sugiriendo que este mecanismo involucraría también la fosforilación en restos de tirosina (Suzuki et al 1998).

El Ca^{2+} y el Al^{3+} , entre otros cationes, estimulan la proliferación de los osteoblastos MC3T3-E1 en cultivo. En estas células se encontró un receptor para Ca^{2+} que activaría a PKC y no involucraría movimientos de Ca^{2+} intracelular ni la activación de la PLC. Inhibidores de PKC bloquean la síntesis de ADN y la expresión del gen c-fos estimulado por el Ca extracelular. Por otro lado, se ha descrito que cationes polivalentes como el Ca^{2+} y el Al^{3+} activan y modulan proteínas G acopladas a segundos mensajeros. Estas observaciones sugieren que el receptor específico para cationes estaría asociado a proteínas G y mediaría la respuesta mitogénica de cationes polivalentes en los osteoblastos MC3T3-E1, a través de PKC (Quarles et al 1994; 1997). Además, el 12-miristato 13-acetato de forbol (**PMA**, por **Phorbol 12-miristate 13-acetate**) y el 1-oleil-2-acetilglicerol (**OAG**), ambos activadores de PKC, estimulan la síntesis de ADN en los osteoblastos. PMA y OAG fueron sinergistas del IGF-I para estimular de síntesis de ADN. Ambos suprimieron el incremento de la actividad de FAL inducida por PTH. Estos datos sugieren que la PKC participaría en la regulación de la proliferación y la diferenciación de los osteoblastos MC3T3-E1 (Kozawa et al 1989).

Por otro lado, se demostró que la síntesis de ADN en osteoblastos MC3T3-E1, involucra una conexión (*cross-talk*) entre la vía dependiente de PKC y la activación de una posible tirosina quinasa citosólica. La síntesis de ADN, estimulada por PMA, estaría asociada con los incrementos en la fosforilación de las ERK1/2 y la activación de Raf-1 y las MAPKs en estas células. La incubación de los osteoblastos con forskolina (**FSK**) aumentó los niveles de AMPc intracelular, inhibió la síntesis de ADN y bloqueó la fosforilación de las ERK1/2 estimuladas por PKC. Estos datos sugieren que PKC participaría, al menos en parte, de las señales mitogénicas de las células MC3T3-E1 y que la vía de la PKA regularía negativamente estas vías (Siddhanti et al 1995).

Existe una relación entre el crecimiento y el comienzo de eventos asociados con la diferenciación del fenotipo osteoblástico. La evidencia acumulada sugiere que varios agentes,

tales como: hormonas, citoquinas y factores de crecimiento están involucrados en la diferenciación osteoblástica. Durante el crecimiento celular se producen diferentes procesos asociados con la biosíntesis de la matriz extracelular. Posteriormente, comienza a reprimirse la expresión de genes que inducen la proliferación y se activan los que están relacionados con el desarrollo osteoblástico, luego, se produce la mineralización de la matriz.

La biosíntesis de colágeno y su acumulación en la MEC estaría relacionada con la expresión del fenotipo osteoblástico en esta línea celular (Franceschi y Iyer 1992). El ácido ascórbico (AA) no estimula la expresión del gen de colágeno tipo I en células MC3T3E1, sin embargo, éste es requerido para la acumulación de colágeno en la matriz extracelular (Quarles et al 1992). En este sistema, el AA incrementa la hidroxilación del procolágeno en restos de prolina ya que actuaría como un cofactor de la enzima prolil-hidroxilasa. El procolágeno hidroxilado está preparado para asumir una conformación de triple hélice, la cual es secretada mucho más rápido que el colágeno no helicoidal, incrementando de esta forma su secreción y acumulación en la MEC. El ácido ascórbico y el β -glicerofosfato parecen ser esenciales para la diferenciación osteoblástica, ya que ambos son requeridos para la expresión de la FAL, osteocalcina y la mineralización de la matriz extracelular. El β -glicerofosfato tiene una acción sinérgica con el ascorbato para producir la acumulación de colágeno en la matriz extracelular y la actividad de la FAL en los osteoblastos. La mineralización del cultivo requiere la presencia de β -glicerofosfato. Así, las células MC3T3-E1 muestran una expresión de las características del desarrollo osteoblástico en función del tiempo, similares a los del hueso in vivo (Quarles et al 1992).

El factor de crecimiento transformante- β (TGF- β) es uno de los más potentes estimuladores de la producción de colágeno tipo I. Además, promueve la síntesis de proteoglicanos y fibronectina, todas proteínas de la matriz extracelular de las células MC3T3-E1. Por otro lado, bloqueantes de la unión integrina $\alpha 2\beta 1$ con la matriz de colágeno inhibieron la diferenciación de las células MC3T3-E1, indicando que la interacción de la integrina $\alpha 2\beta 1$ con la matriz de colágeno jugaría un papel importante en la diferenciación osteoblástica estimulada por la MEC (Takeuchi et al 1996).

Suzuki y colaboradores (Suzuki et al 2002) estudiaron el compromiso de las MAPK, p38 y ERKs, en los efectos del suero bovino fetal sobre el crecimiento de las células MC3T3-E1. Encontraron que la vía de las ERKs estaba implicada en el efecto mitogénico, mientras que la vía de la p38 estaría relacionada con la diferenciación inducida por el suero bovino.

Otro modelo utilizado en estudios *in vitro* de células de tipo osteoblasto murino es la línea **UMR106** derivada de un sarcoma osteogénico de rata, inducido con ^{32}P , que fue preservado por trasplante en la misma colonia de ratas. Esta línea, a diferencia de las MC3T3-E1, tiene la característica fenotípica de un osteoblasto diferenciado, pero inmaduro: expresa altos niveles de fosfatasa alcalina (**FAL**) y colágeno de tipo I; pero no expresan osteocalcina, ni osteonectina, ni forma mineral óseo en cultivo. Otra característica importante de esta línea celular es que posee receptores para GF, insulina y PTH.

Se realizó un estudio comparativo de las propiedades bioquímicas de líneas celulares monoclonales y no monoclonales de un osteosarcoma y células enriquecidas en osteoblastos normales, todas obtenidas a partir de ratas. Se utilizó la actividad de fosfatasa alcalina y la activación de la adenilato ciclasa (**AC**) en respuesta a PTH como marcadores osteoblásticos. Ambos parámetros fueron conservados a través de los sucesivos pasajes. El estudio mostró que las células monoclonales derivadas del osteosarcoma, entre otras las UMR106, son líneas tumorales altamente diferenciadas que conservan propiedades de osteoblastos maduros. Además, los autores sugieren que éste es un buen modelo disponible para el estudio de efectos mediados por hormonas y agentes similares en osteoblastos maduros (Partridge et al 1983).

La hormona PTH posee efectos anabólicos y catabólicos en el hueso y esta relacionada con la resorción ósea. Activa principalmente la adenilato ciclasa (**AC**) y la fosfolipasa C (**PLC**, por *Phospho-Lipase C*), ambas mediadas por proteínas G heterotriméricas.

Los GF estimulan la proliferación de los osteoblastos UMR106, mientras que, hormonas como la PTH la inhiben. El efecto proliferativo de los GF estaría mediado por la activación de las ERKs y en particular de la p42. La hormona paratiroidea antagoniza el efecto de los GF al inhibir la activación de las MAPKs por un mecanismo dependiente de AMPc / PKA (Verheijen y Difize 1995). El IGF-I, al igual que otros GF, activa las ERKs y estimula la proliferación de las células UMR106. Interesantemente, IGF-I regula negativamente la expresión del receptor para PTH, efecto que ocurre a través de la vía de las ERKs (Kawane y Horiuchi 1999). Estudios realizados en diferentes líneas osteoblásticas mostraron que diversos GF activan de distinta forma a las ERKs. En las células UMR106 los GF activan ambas MAPKs (ERK-1/2) mientras que, en las células MC3T3-E1 activan solo la ERK2. En ambas líneas celulares, PTH y análogos del AMPc bloquearon la actividad de las ERKs (Chaudhary et al 1998).

En una línea de células similares a las UMR106, las UMR106-01, se describieron transportadores de glucosa GLUT 1 y 3, los cuales fueron regulados positivamente por la insulina. Las células UMR106 poseen receptores para la insulina y responden a ésta incrementando la captación de glucosa, probablemente, a través de los transportadores de glucosa 1 y 3, favoreciendo la estimulación del metabolismo de la glucosa (Ituarte et al 1989; Thomas et al 1996a,b).

Como se mencionó anteriormente, las células UMR106 expresan un fenotipo osteoblástico diferenciado con altos niveles de fosfatasa alcalina. La PTH regula la diferenciación osteoblástica estimulando la actividad de FAL. Análogos del AMPc, activadores de PKA, estimulan la actividad de FAL, mientras que, la inhibición de PKC no afecta esta actividad, sugiriendo que PTH promovería la diferenciación osteoblástica a través de una vía dependiente de la AC e independiente de la PLC (Kano et al 1994).

Objetivos

“Aquí no valen doctores,
Sólo vale la esperencia;
Aquí verían su inocencia
Esos que todos lo saben;
Porque esto tiene otra llave
Y el gauchito tiene su cencia.”

José Hernández. Verso 253

1. OBJETIVOS GENERALES

- Sintetizar e identificar diversos compuestos de vanadio con ligandos de interés biológico y farmacológico.
- Evaluar el efecto de los compuestos de vanadio(IV) sobre la actividad específica de diferentes fosfatasas.
- Estudiar los efectos biológicos de los derivados de vanadio sobre células osteoblásticas en cultivo.
- Seleccionar complejos de vanadio(IV) con potencial aplicación farmacológica.
- Investigar el mecanismo de acción de los complejos de vanadio(IV) seleccionados.

1.1 Objetivos Específicos

1. Sintetizar e identificar complejos del catión vanadilo(IV) con azúcares simples y compuestos relacionados.
2. Estudiar el efecto inhibitorio de los complejos del catión vanadilo(IV) sobre la actividad específica de fosfatasa alcalina de origen intestinal y óseo.
3. Evaluar los efectos de los complejos de vanadio(IV) sobre la proliferación, diferenciación, consumo de glucosa, morfología celular y citotoxicidad de células osteoblásticas en cultivo.
4. Seleccionar complejos de vanadio(IV) con actividad insulinoimimética y antitumoral.
5. Estudiar el efecto de los complejos de vanadio(IV) con potencial aplicación farmacológica sobre las diferentes etapas del desarrollo osteoblástico.
6. Investigar los posibles mecanismos de acción implicados en algunos de los efectos biológicos y farmacológicos de los complejos seleccionados.

Materiales y Métodos

“ *Y* tené fe en el remedio,
Pues la cencia no es chacota;
De esto no entendés ni jota;
Sin que ninguno sospeche
Cortale a un negro tres motas
Y hacélas hervir en leche.”

José Hernández. Verso 846

MATERIALES Y MÉTODOS

1. SÍNTESIS DE COMPUESTOS DE VANADIO.

En el marco de un proyecto colaborativo de la Cátedra de Bioquímica Patológica y el Centro de Química Inorgánica (CEQUINOR) se han sintetizado y caracterizado diferentes complejos de vanadio con ligandos orgánicos de interés biológico o farmacológico. Estos compuestos tienen potencial aplicación en el campo de la Diabetes mellitus y otras enfermedades como el Cáncer (Heyliger et al 1985; Evangelou 2002). En relación con este trabajo de tesis, se sintetizaron y caracterizaron complejos del catión vanadilo(IV) con monosacáridos y disacáridos. Además, se obtuvieron complejos con derivados de azúcares reducidos (polialcoholes) y azúcares oxidados (ácidos polihidroxilados). Con el objetivo de estudiar los efectos de modificaciones estructurales de estos ligandos, se buscaron otros compuestos que tuvieran una estructura diferente, pero relacionada, como lo son los derivados de polioles cíclicos y heterociclos hidroxilados.

La técnica de síntesis de estos complejos de vanadio es similar para todos ellos. Los complejos se obtuvieron mezclando 1 mmol de VOCl_2 con 2 mmoles de ligando en 10 ml de agua destilada. Posteriormente, se adicionó NaOH o KOH sólido hasta alcanzar un pH de 12 o 13 dependiendo del ligando; la solución de complejo formado se trasvasa a otro recipiente y el complejo es precipitado con etanol absoluto. El precipitado se filtra y se lava con etanol absoluto frío y se almacena en estufa a 60 °C. Al utilizar como ligandos los ácidos polihidroxilados se obtuvieron 4 complejos diferentes (dos a pH ácido y dos a pH alcalino). En estos casos, el pH de la mezcla se ajustó con NaOH o KOH 1 M. Luego se procedió igual que en los casos anteriores (Barrio et al 1997; Etcheverry et al 1997; Williams et al 2000, Etcheverry et al 2001, Barrio et al 2003, Williams et al 2004).

Una vez sintetizados, los complejos fueron caracterizados fisicoquímicamente por diferentes técnicas, tales como análisis elemental, espectroscopía electrónica en solución y reflectancia difusa, espectroscopía IR, análisis termogravimétrico (TG), análisis térmico diferencial (DTA) y determinaciones de susceptibilidad magnética.

1.1. Complejos de vanadilo(IV) con diferentes ligandos.

1.1.1. Monosacáridos

Ligandos		Fórmula molecular de los complejos	Sigla
Aldosas	Glucosa	$\text{Na}_3[\text{VO}(\text{Glucosa})_2\text{OH}].5\text{H}_2\text{O}$	GluVO
Cetosa	Fructosa	$\text{Na}_6[(\text{VO})_2(\text{Fructosa})_5].4\text{H}_2\text{O}$	FruVO

1.1.2. Disacáridos

Ligandos		Fórmula molecular de los complejos	Sigla
Reductores	Maltosa	$\text{Na}_5[\text{VO}(\text{Maltosa})_2\text{OH}].10\text{H}_2\text{O}$	MalVO
	Lactosa	$\text{Na}_4[\text{VO}(\text{Lactosa})_2].3\text{H}_2\text{O}$	LacVO
No Reductores	Sacarosa	$\text{Na}_3[\text{VO}(\text{Sacarosa})_2\text{OH}].\text{H}_2\text{O}$	SacVO
	Trehalosa	$\text{Na}_6[\text{VO}(\text{Trehalosa})_2].4\text{H}_2$	TreVO

1.1.3. Polioles lineales

Ligandos		Fórmula molecular de los complejos	Sigla
Alditales	Galactitol	$\text{Na}_2[\text{VO}(\text{Galactitol})_2].\text{H}_2\text{O}$	GolVO
	Sorbitol	$\text{Na}_2[\text{VO}(\text{Sorbitol})_2].\text{H}_2\text{O}$	SolVO
	Manitol	$\text{Na}_2[\text{VO}(\text{Manitol})_2].\text{H}_2\text{O}$	ManVO

1.1.4. Polialcoholes cíclicos

Ligandos (cilitales)		Fórmula molecular de los complejos	Sigla
Saturados	mioinositol	$\text{Na}_2[\text{VO}(\text{Inositol})_2].\text{H}_2\text{O}$	InoVO
Insaturados	Conduritol C	$\text{Na}_2[\text{VO}(\text{Conduritol C})_2].\text{H}_2\text{O}$	ConVO

1.1.5. Ácidos polihidroxilados

Ligandos		Fórmula molecular de los complejos	Sigla
Ácidos Aldónicos	Ácido glucónico (pH: 5)	$\text{Na}_2[\text{VO}(\text{Gluconato})_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$	AGluVO_{pH: 5}
	Ácido glucónico (pH: 12)	$\text{Na}_4[\text{VO}(\text{Gluconato})_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	AGluVO_{pH: 12}
Ácidos Aldáricos	Ácido sacárico (pH: 4)	$\text{K}_2[\text{VO}(\text{Sacarato})_2] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	ASacVO_{pH: 4}
	Ácido sacárico (pH: 12)	$\text{K}_5[\text{VO}(\text{Sacarato})_2] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	ASacVO_{pH: 12}

1.2. Características estructurales de los complejos del catión vanadilo(IV)

Los complejos de vanadilo(IV) con **monosacáridos y disacáridos** son todos monoméricos y poseen una relación ligando : metal (L/M) de 2 : 1, excepto el complejo de fructosa que tiene una relación L/M de 5 : 2. La geometría de coordinación para estos compuestos es octaédrica y la coordinación axial es por cuatro grupos OH desprotonados en posición *cis* de los azúcares. La presencia de posiciones *cis* coordinantes es fundamental para la obtención de los complejos. La posición *trans* respecto del grupo oxo del catión vanadilo está ocupada por un OH de la solución. El complejo de **fructosa** posee una relación L/M de 5 : 2 y la sexta posición está ocupada por una molécula de ligando que forma un puente entre dos centros metálicos.

La **trehalosa** es un disacárido no reductor y no tiene dos grupos OH en posición *cis* que le permita, en principio, coordinar al vanadilo como es el caso de los otros azúcares; sin embargo, la estructura cristalina de la trehalosa dihidratada -determinada por rayos X de un monocristal- (Taga et al 1972) revela una estructura con una conformación muy particular en la cual existen dos OH en posición *cis* unidos a las dos moléculas de agua. Probablemente, en el complejo TreVO, el catión vanadilo ocupe la posición de las moléculas de agua lo que permite la rápida complejación del mismo por la trehalosa.

Se han sintetizado cuatro complejos con **Ácido D-Glucónico y D-Sacárico** a pH=4, 5 y 12. Los complejos son monoméricos y en ninguno de los casos habría moléculas de agua ocupando la posición *trans* respecto del grupo oxo.

Los complejos con ácido glucónico obtenidos a pH=5 y 12 presentarían una geometría de coordinación de pirámide de base cuadrada. Para el primer caso (pH=5), el ligando coordinaría al vanadilo a través de un oxígeno del carboxilo y el oxígeno del grupo OH del C₂. En el segundo caso (pH=12), el oxometal sería coordinado por dos oxígenos de dos grupos OH adyacentes desprotonados.

Los complejos de vanadilo(IV) con ácido sacárico obtenidos a pH=4 y 12 presentarían una coordinación similar al complejo con ácido glucónico a pH=5. Sin embargo, para el complejo con ácido sacárico a pH=12 podría existir otra posibilidad. En la posición *trans* respecto del grupo oxo, habría un grupo carboxilato formando un entorno octaédrico distorsionado.

Los complejos con **polioles lineales** de fórmula general Na₂[VO(L)₂].H₂O fueron preparados de forma similar a los complejos con azúcares. La coordinación del metal involucraría los grupos alcohólicos del ligando. Los espectros UV-vis muestran un patrón de bandas similar a los obtenidos con los complejos con azúcares con un par de grupos OH desprotonados.

Para el caso de los **polioles cíclicos**, la síntesis es similar a la de los lineales. Los complejos obtenidos presentan una fórmula molecular diferente, sin embargo la coordinación del metal sería también por grupos OH desprotonados, similar a la encontrada para los azúcares y polioles lineales.

2. ESTUDIOS BIOLÓGICOS

2.1. Estudios acelulares

2.1.1. Preparación de extractos celulares

Para preparar homogenados celulares crudos, se utilizaron células UMR106 subconfluentes replicándose activamente en frascos de 150 cm². Estos cultivos se lavaron con PBS y se solubilizaron con Tritón X-100 0,1 %, luego se centrifugaron 5 minutos a 1000 x g. El sobrenadante se recuperó y se midió la concentración total de proteínas en estos homogenados

utilizando el método colorimétrico de Bradford (Bradford 1979). Posteriormente, el sobrenadante se fraccionó en tubos de 1,5 ml y las alícuotas se guardaron a - 20 °C hasta su utilización.

2.1.2. Ensayo de inhibición de la actividad de fosfatasas

El efecto inhibitorio de diferentes especies de vanadio(IV) sobre fosfatasas tales como la FAL de origen comercial o de extractos celulares, se determinó espectrofotométricamente a 405 nm, a 37 °C. Para ello, se mezcló de 1 a 10 µg de proteína -dependiendo de la actividad específica de las fosfatasas- en 880 µl de solución reguladora conteniendo 20 mM de KCl y MgSO₄ 0,55 mM. Luego, se agregaron 10 µl de una dilución en agua del compuesto a estudiar (se realizaron curvas dosis – respuesta de 2,5 a 100 µM). La reacción se inició con el agregado de 100 µl de *p*-nitrofenilfosfato (*p*-NPP) en solución reguladora y a los 7 minutos se determinó la formación del producto de reacción: *p*-nitrofenol (*p*-NP) midiendo la absorbancia a 405 nm. La reacción entre la enzima y el sustrato en estas condiciones de reacción fue lineal al menos hasta los 15 min. La velocidad inicial de reacción se expresó en nmol de *p*-NP / min. Previamente, con un patrón de *p*-NP se realizó una curva de calibración y se determinó la relación entre la absorbancia y los nmol de *p*-NP (nmol *p*-NP = DO x 60, rango [1,0 – 60,0 nmol *p*-NP]).

2.2. Estudios celulares

2.2.1. Cultivos celulares.

Se utilizó como sistema modelo *in vitro* el cultivo de dos líneas clonadas de células osteoblasto-similes: UMR106, derivada de un osteosarcoma de rata, y una línea de células no transformadas MC3T3E1, derivada de calvaria de ratón.

En particular, la línea MC3T3-E1 es un tipo de células que expresan diferentes genes y marcadores osteoblásticos en función del tiempo de cultivo, pasando secuencialmente por los estadios de proliferación, diferenciación y mineralización. Estudios previos han demostrado que el cultivo de estas células en un medio suplementado con β-glicerofosfato 5 mM y ácido ascórbico 140 µM, induce su progresión a través de etapas de desarrollo muy similares a las observadas en cultivos primarios de osteoblastos. Este modelo *in vitro* refleja en gran medida los

procesos de desarrollo del hueso *in vivo* (Quarles et al 1992).

La línea de células UMR106 expresa marcadores de un fenotipo osteoblástico diferenciado. Éstos incluyen la expresión de fosfatasa alcalina ósea, la síntesis de colágeno de tipo I y la regulación de niveles intracelulares de AMP cíclico por PTH, entre otros marcadores (Partridge et al 1983).

Ambas líneas de células fueron cultivadas en frascos de plástico de 75 cm² a 37 °C en una atmósfera humidificada con 5 % CO₂, en un medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado con 10 % de suero bovino fetal (FBS), penicilina (100 UI/ml) y estreptomicina (100 µg/ml). Después de 3 a 5 días (el tiempo necesario para que lleguen a subconfluencia), las células se cosecharon usando tripsina-EDTA en PBS para resuspenderlas. Una fracción de células se diluyó 1:10 en DMEM con 10 % FBS para continuar el cultivo y la otra fracción se utilizó para realizar los experimentos. Las células se plaquearon en platos de 24 ó 48 pocillos, a una densidad de plaqueo de $2,5 \times 10^4$ células / pocillo. Luego se cultivaron en DMEM con 10 % FBS hasta llegar nuevamente a la subconfluencia deseada, se lavaron dos veces con DMEM y se incubaron en DMEM sin suero (para evitar la influencia de los factores de crecimiento propios del suero), en presencia de los complejos de vanadio (cuya acción sobre la proliferación celular se está investigando), de acuerdo con lo requerido para cada ensayo en particular. En los casos en los cuales se estudió el efecto de los compuestos de vanadio en los diferentes estadios de diferenciación, las células MC3T3-E1 confluentes se incubaron en DMEM suplementado con suero bovino fetal (10 %), penicilina (100 UI/ml), estreptomicina (100 µg/ml), anfotericina B (0,3 µg/ml), ácido ascórbico (25 µg/ml) y β-glicerolfosfato (5 mM). Este medio de cultivo se cambió cada dos días.

2.2.2. Ensayo de proliferación celular.

2.2.3. Bioensayo del Cristal violeta.

La proliferación celular se estimó por medio del ensayo mitogénico del cristal violeta (Okajima et al 1992). El fundamento de este ensayo se basa en el hecho de que el cristal violeta es incorporado por ciertas estructuras subcelulares, en particular por las mitocondrias de las células metabólicamente activas, pero no por células inactivas. En nuestros experimentos, los cultivos se

fijaron con glutaraldehído al 5 % en PBS y se colorearon con cristal violeta al 0,5 %. El colorante incorporado por las células se extrajo con buffer glicina / HCl pH=3,0 que contiene 30 % de metanol. El extracto se diluyó adecuadamente con agua destilada y se midió la absorbancia a 540 nm. Previamente, se demostró que los valores de absorbancia obtenidos con este ensayo correlacionan en forma directa con el recuento de células vivas en cámara de Neubauer ($r=0,897$; $p<0,001$) (Cortizo y Etcheverry 1995).

2.2.4. Ensayos de diferenciación celular.

2.2.4.1. Actividad específica de FAL.

Con el objeto de medir la actividad específica de FAL en los osteoblastos, la monocapa de células en cultivo se solubilizó con 0,1 % de Tritón X-100. Se utilizaron alícuotas de este extracto celular total para determinar la concentración de proteínas por el método de Bradford. La actividad de FAL del extracto se determinó luego por incubación de una alícuota del mismo con el sustrato *p*-NPP 5 mM en un buffer glicina 55mM / $MgCl_2$ 0,55mM pH=10,5, a 37 °C durante 10 minutos. La producción de *p*-NP se determinó midiendo la absorbancia a 405 nm (Cortizo y Etcheverry 1995). La actividad celular específica de FAL se expresó en nmol *p*-NP / min x mg proteína total. La FAL es un marcador de fenotipo osteoblástico maduro, y por ese motivo, la determinación de su actividad específica es utilizada para evaluar el grado de diferenciación en este tipo de cultivos (Stein y Lian 1993; Cortizo y Etcheverry 1995).

2.2.4.2. Determinación de colágeno

La síntesis de colágeno tipo I es una característica del fenotipo osteoblástico. Se utilizó un método histoquímico adaptado para determinar el colágeno producido por osteoblastos (Tullberg-Reinert y Jundt 1999). Las células se cultivaron bajo diferentes condiciones experimentales en platos multipocillos. Luego, se lavaron tres veces con PBS y se fijaron 1 hora con 1 ml de solución fijadora (15 ml de solución de ácido pícrico / 5 ml de formaldehído al 35 % y 1 ml de ácido acético glacial). Posteriormente, se lavaron 15 minutos con $H_2O_{(d)}$ con agitación suave y se colorearon 1 hora con 1 ml de colorante (100 mg de Sirius Red en 100 ml de una solución

saturada de ácido pícrico), también con agitación suave. Seguidamente, se lavaron con HCl 0,01 N hasta sacar todo el exceso de Sirius Red. El colágeno producido por las células se observó con microscopio óptico y se fotografió. A continuación, el colorante fijado al colágeno se extrajo con 1 ml de NaOH 0,1 N con agitación suave por el término de 30 minutos. Luego, se determinó la absorbancia a 550 nm. El contenido de colágeno producido por los osteoblastos se obtiene de la curva de calibración (μg de colágeno vs absorbancia).

2.2.5. Consumo de glucosa por los osteoblastos.

El consumo de glucosa por los osteoblastos se determinó indirectamente midiendo la concentración de glucosa remanente en el medio de cultivo de las células, luego de la incubación de las mismas con los derivados de vanadio, utilizando para ello el método de la glucosa oxidasa (Trinder 1969; Okajima et al 1992). Una vez que los osteoblastos alcanzaron la confluencia en los pocillos, la monocapa de células se lavó dos veces con DMEM con baja concentración de glucosa (1,0 g / l) y las células se ayunaron toda la noche en este medio. Finalmente, las células se incubaron en este medio en presencia de los complejos de vanadio por un tiempo preestablecido (entre 4 y 8 horas, tiempo en el cual el consumo de glucosa es lineal), se tomó una alícuota del medio de cultivo y se determinó el contenido de glucosa remanente. La monocapa de células se solubilizó en 0,1 % de Tritón X-100 y se determinó proteínas totales por el método de Bradford (Bradford 1976). El consumo de glucosa por los osteoblastos se expresó como: (μg de glucosa inicial - μg de glucosa final) / mg de proteínas totales en cada pocillo.

2.3. Estudios morfológicos

2.3.1. Tinción con Giemsa.

Las características morfológicas del citoplasma y el núcleo de las células pueden observarse por medio de una tinción con Giemsa. Luego de que las células fueron incubadas una noche con los compuestos de vanadio, insulina o controles, se lavaron con PBS y se fijaron 5 min con metanol. Posteriormente, se tiñeron 10 min con una dilución 1:10 de Giemsa. Finalmente, los platos se

lavarón con agua y las células fueron observadas con un microscopio óptico. Las imágenes se registraron con una cámara de fotos adaptada al microscopio.

2.3.2. Estudios del citoesqueleto por Inmunofluorescencia.

Las células fueron cultivadas sobre cubreobjetos de vidrio en platos de 6 pocillos. Luego de incubarlas en diferentes condiciones experimentales se lavaron con PBS y se fijaron 10 minutos con *p*-formaldehído al 4 % en PBS. A continuación, las células se lavaron 3 veces con PBS y se permeabilizaron con etanol puro a -20 °C por 4 minutos. Posteriormente, se lavaron 3 veces con PBS y las uniones inespecíficas se bloquearon 2 horas con 10 % de suero de cabra en PBS. A continuación, se incubaron 2 h con FITC-Paloidina (1:100) para visualizar las fibras de actina. Posteriormente, se lavaron 3 veces con PBS -7 minutos cada vez - en la oscuridad y con agitación suave. En el momento del montaje se agregó una gota de líquido de montar (Vectashield-DAPI) y se colocó el cubreobjetos invertido sobre un portaobjetos, los bordes se sellaron con esmalte de uñas y se observó el preparado con un microscopio de fluorescencia.

2.4. Estudios de mecanismos de acción

2.4.1. Ensayo de Western blot

Los efectos de los derivados de vanadio sobre los contenidos de diferentes proteínas específicas y su grado de fosforilación se determinaron por Western blot. Se utilizaron extractos celulares – de diferentes condiciones experimentales- en solución reguladora de Laemmli (Laemmli 1970), la cual contiene Tris 62,5 mM, pH=6,80 con 2 % dodecilsulfato de sodio (SDS), 5 % β -mercaptoetanol, 0,001 % azul de bromofenol y 10 % glicerol. Una fracción de estos extractos se sometió a una electroforesis en gel discontinuo y desnaturizante de poliacrilamida (4 % *stacking* y 12,5 % para el gel separador) conteniendo 10 % de SDS. Una vez realizada la corrida durante (30 min a 100 mV para el *stacking* y 120 mV para el desarrollo de la electroforesis separativa), las proteínas del gel se transfirieron (una noche a 50 mA) a un papel de nitrocelulosa, el cual luego se bloqueó 2 h con leche descremada al 3 % en PBS -solución de bloqueo- a temperatura ambiente con agitación suave. Las proteínas estudiadas fueron detectadas

con anticuerpos específicos -primer anticuerpo- los cuales a su vez se unen a un segundo anticuerpo conjugado con enzima peroxidasa. Brevemente, el papel de nitrocelulosa se incubaba una noche con el primer anticuerpo diluido (1:1000 o 1:5000 dependiendo del extracto celular) en solución de bloqueo, luego se lava tres veces durante 15 min c / u con PBS conteniendo 0,1 % de Tween y se incubaba 2 h con una dilución 1:1000 en solución de bloqueo a temperatura ambiente con agitación suave. Luego, se lava tres veces durante 15 min c / u con PBS conteniendo 0,1 % de Tween y se revela por la técnica de electroquimioluminiscencia. Las bandas de la placa radiográfica se *escanearon* y con el programa *Scion Imagen* se realizó un densitograma a partir del cual se calcularon las áreas relativas de los picos.

Para poder detectar y cuantificar separadamente las proteínas fosforiladas y la proteína específica total de señalización (fosforiladas más no fosforiladas) en el mismo papel de nitrocelulosa (misma corrida) es necesario realizar un *striping* luego de la primera cuantificación.

Striping: El *striping* se realizó a 55 °C durante 30 minutos con una solución que contiene solución reguladora a base de Tris 65 mM pH= 6,80 con 2 % SDS y 10 % β-mercaptoetanol. Luego, el papel de nitrocelulosa se bloqueó nuevamente y se continuó como se describe anteriormente para la detección de las proteínas fosforiladas.

2.4.2. Ensayos con inhibidores

Para estudiar el mecanismo de acción y las vías utilizadas por los compuestos de vanadio para ejercer sus efectos insulinomiméticos, se usaron diferentes inhibidores de las vías de señalización utilizadas por la insulina y de las vías que regulan a las mismas. Se estudió la vía de las ERKs con el inhibidor PD98059, de la PI3-K con wortmanina como inhibidor, de la PKC usando PMA y estaurosporina como inhibidores y de quinasas citosólicas utilizando estaurosporina como inhibidor de las mismas.

Las células confluentes se lavaron dos veces con DMEM y luego se las incubó 30 minutos con DMEM en presencia de los diferentes inhibidores. Luego de esta preincubación, sin sacar el medio condicionado, se agregaron los complejos de vanadio y se estudiaron los parámetros, tales como activación de las ERKs, consumo de glucosa y proliferación.

Por otro lado se estudió el efecto de antioxidantes como la mezcla de Vitamina E y ácido ascórbico sobre los parámetros antes mencionados. En el caso particular de los antioxidantes, las células se preincubaron 6 h con la mezcla de vitaminas.

3. TÉCNICAS AUXILIARES

3.1 Determinación de proteínas por el método de Bradford.

La determinación de proteínas se llevó a cabo por el método de Bradford (Bradford 1976). Se confeccionó una curva de calibración utilizando albúmina sérica bovina; el rango de validez de la curva fue de 5 a 50 μg de proteína por tubo. La determinación se realizó mezclando 25 μl de muestra con 2 ml de reactivo de Bradford, luego de 5 minutos se registró la absorbancia a 595 nm.

4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Se realizaron al menos tres experimentos independientes (cada uno por triplicado) para cada condición experimental. Cuando correspondía, los resultados se expresaron como la media \pm SEM (error estándar de la muestra). El análisis estadístico de los datos se realizó utilizando el test *t* de Student. Los análisis de correlación lineal se llevaron a cabo por medio del coeficiente de correlación de Pearson (Marona 1995).

Resultados

“*Para* explicar el misterio
Es muy escasa mi cencia:
Lo castigó, en mi conciencia,
Su Divina Magestá:
Donde no hay casualidá
Suele estar la providencia.”

José Hernández. Verso 613

RESULTADOS.

1. Efecto del vanadio sobre la actividad específica de fosfatasa alcalina intestinal y ósea.

Se han utilizado diferentes modelos y sistemas para estudiar la potencia y eficacia farmacológica del vanadio. Entre ellos, los efectos sobre diversos sistemas enzimáticos son un modelo simple que nos permite estudiar sus propiedades inhibitorias sobre diferentes fosfatasas. Para evaluar los efectos inhibitorios del vanadio se analizó su potencia (definida como la concentración de vanadio necesaria para inhibir el 50 % de la actividad de FAL) y su eficacia (definida como la máxima inhibición producida a 100 μM).

1.1. Fosfatasa alcalina de origen intestinal.

Figura 1. Efectos del vanadio y sus complejos con sacarosa y trehalosa sobre la actividad específica de fosfatasa alcalina intestinal.

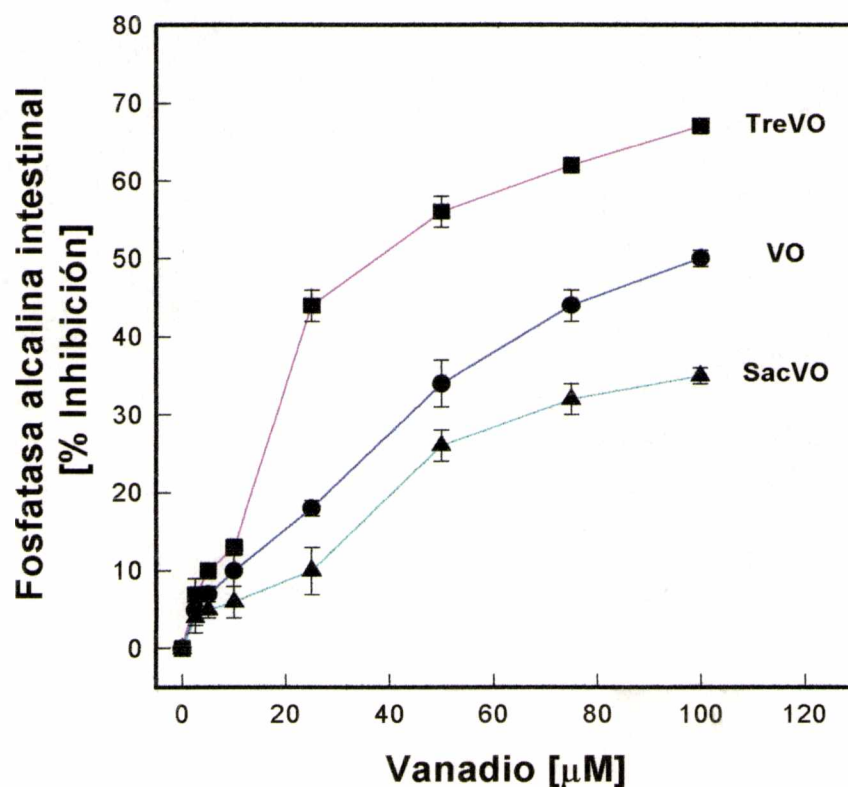


Figura 1. La fosfatasa alcalina de origen intestinal (1 μg / ml) fue incubada en solución reguladora de glicina pH= 10,5 en presencia de diferentes concentraciones de vanadilo(IV), TreVO o SacVO. El tiempo de incubación fue de 10 min y la reacción es lineal al menos hasta los 15 min. En ausencia de los complejos de vanadio se determinó la actividad específica basal (36 nmol *p*-NP / 10 min / μg de enzima). Los resultados se expresan como porcentaje de inhibición de la actividad basal como la media \pm SEM.

En la figura 1 se muestra la inhibición de la actividad específica de fosfatasa alcalina intestinal por el catión vanadilo(IV) y sus complejos con trehalosa y sacarosa. Puede verse que el efecto de estos compuestos es dependiente de la dosis (2,5 – 100 μM), siendo el TreVO el más potente y eficaz. El vanadilo(IV) es un inhibidor moderado de la actividad específica de FAL y el complejo de sacarosa es el menos potente y eficaz de los tres. Sobre la base de gráficos, como el que se muestra en la figura 1, se estimó la concentración de complejo de vanadio que inhibió el 50 % de la actividad específica de la enzima [DI₅₀] y la máxima inhibición producida a 100 μM [IM₁₀₀]. Los resultados se muestran en la tabla I.

Tabla I: Efectos de diversos complejos de vanadilo(IV) sobre la actividad de fosfatasas.

FOSFATASA ALCALINA				
COMPUESTOS DE VANADIO	INTESTINAL		ÓSEA	
	DI₅₀ [μM]	IM₁₀₀ [% Inhibición]	DI₅₀ [μM]	IM₁₀₀ [% Inhibición]
VO	100	50 \pm 1,3	35	70 \pm 1,5
GluVO	32	65 \pm 1,3		
FruVO	38	66 \pm 2,0	75	55 \pm 2,0
MalVO	95	53 \pm 1,0		
LacVO	> 100	47 \pm 1,5	60	58 \pm 2,0
SacVO	> 100	40 \pm 2,0	46	62 \pm 1,7
TreVO	30	67 \pm 1,5	90	54 \pm 2,5

GolVO	100	$49 \pm 1,0$	37	$72 \pm 1,5$
SolVO	100	$49 \pm 1,0$		
MolVO	100	$51 \pm 1,2$		
InoVO	> 100	$34 \pm 1,6$	35	$75 \pm 2,5$
ConVO	> 100	$30 \pm 1,0$		
AGluVO _{pH: 5}	> 100	$45 \pm 2,0$		
AGluVO _{pH: 12}	88	$56 \pm 1,8$		
ASacVO _{pH: 4}	> 100	$48 \pm 1,2$	45	$66 \pm 2,0$
ASacVO _{pH: 12}	90	$53 \pm 1,6$	> 100	$40 \pm 1,9$

Todos los resultados de IM_{100} son altamente significativos ($p < 0,001$)

Es interesante remarcar algunos resultados encontrados. Los complejos con monosacáridos (GluVO, FruVO) produjeron valores de $[DI_{50}]$ y $[IM_{100}]$ muy similares, mientras que los complejos con disacáridos (SacVO, LacVO, MalVO y TreVO) son diferentes entre sí. El compuesto de lactosa y los alcoholes lineales (galactitol, sorbitol y manitol) fueron similares al vanadilo(IV), el de trehalosa fue el más potente y eficaz de todos los complejos de vanadilo(IV) estudiados y los derivados de alcoholes cíclicos (InoVO y ConVO) fueron los menos potentes y eficaces para inhibir la fosfatasa alcalina de origen intestinal.

Sobre la base de los parámetros estimados a partir de las curvas dosis-respuesta podemos establecer un orden de eficacia para los compuestos de vanadio para inhibir la actividad específica de fosfatasa alcalina de origen intestinal:

TreVO \geq FruVO \geq GluVO $>$ AGluVO_{pH: 12} $>$ MalVO = ASacVO_{pH: 12} $>$ MolVO \geq VO \geq GolVO = SolVO \geq ASacVO_{pH: 4} \geq LacVO \geq AGluVO_{pH: 5} $>$ SacVO $>$ InoVO \geq ConVO.

Si los ordenamos de acuerdo a la potencia encontraremos el siguiente orden:

TreVO \geq GluVO \geq FruVO $>$ AGluVO_{pH: 12} \geq ASacVO_{pH: 12} $>$ MalVO $>$ VO = GolVO = SolVO = MolVO $>$ ASacVO_{pH: 4} \geq LacVO \geq AGluVO_{pH: 5} $>$ SacVO $>$ InoVO \geq ConVO.

Al compararlo con el orden de eficacia vemos que los complejos de glucosa y fructosa han invertido su orden al igual que los complejos de ácido sacárico y maltosa. Además, podemos observar que los complejos que fueron más eficaces que el vanadilo también son más potentes y

los que mostraron ser menos efectivos también fueron menos potentes para inhibir la actividad de la FAL intestinal.

1.2. Fosfatasa alcalina de origen óseo.

Figura 2. Efectos del vanadilo(IV) y sus complejos con sacarosa y trehalosa sobre la actividad específica de fosfatasa alcalina ósea.

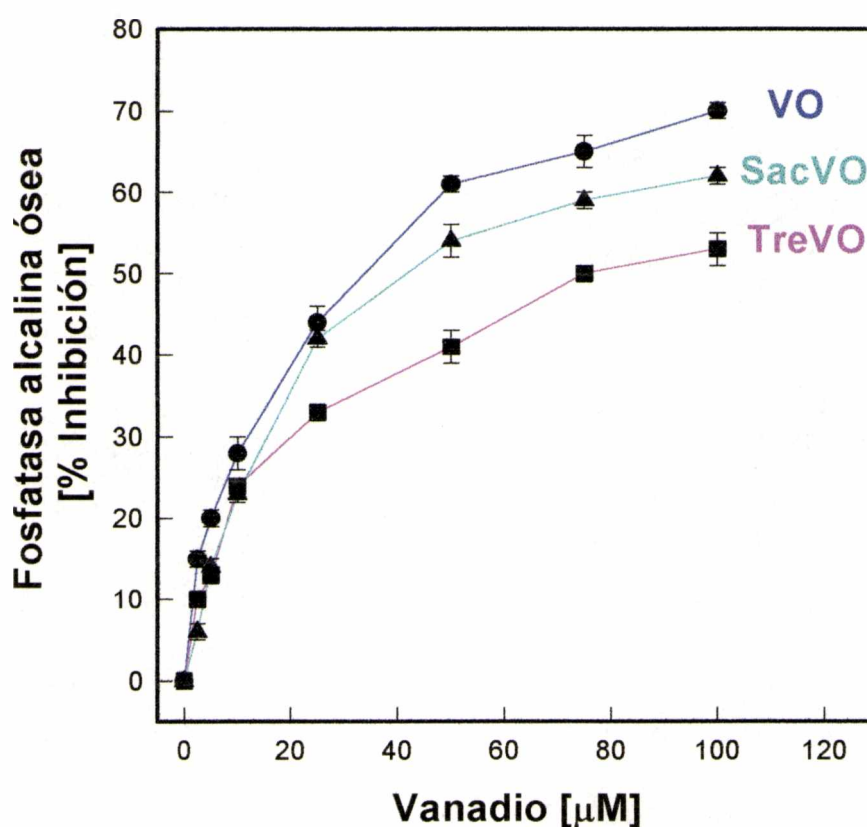


Figura 2. La fosfatasa alcalina ósea (5 μ g de proteína / ml) fue incubada en solución reguladora de glicina pH= 10,5 en presencia de diferentes concentraciones de vanadilo(IV), TreVO o SacVO. El tiempo de incubación fue de 10 min y la reacción es lineal al menos hasta los 15 min. En ausencia de los complejos de vanadio se determinó la actividad específica basal (30 nmol *p*-NP / 10 min / 5 μ g de

proteína). Los resultados se expresan como porcentaje de inhibición de la actividad basal como la media \pm SEM

Con el objetivo de comparar la potencia y efectividad de los complejos de vanadio(IV) para inhibir fosfatasas de diferente origen, se obtuvieron extractos de osteoblastos UMR106 y se determinaron los porcentajes de inhibición de la actividad específica de fosfatasa alcalina ósea para diferentes concentraciones de vanadio. Para ello, seleccionamos algunos complejos de vanadilo(IV) representativos de los diferentes grupos de ligandos.

En la figura 2 se muestran gráficos representativos para tres de los compuestos estudiados: vanadilo, SacVO y TreVO. Como podemos observar, la potencia y efectividad de los compuestos de vanadio(IV) para inhibir la actividad de fosfatasa alcalina ósea es diferente que para la intestinal (Fig. 1). Los complejos con alcoholes (InoVO y GolVO) y el vanadilo resultaron ser los inhibidores más potentes y eficaces de todos los complejos ensayados para inhibir la FAL ósea. Los complejos con ácidos obtenidos a diferente pH (ASacVO_{pH:4} y ASacVO_{pH:12}) fueron significativamente diferentes entre sí, el complejo obtenido a pH ácido fue más potente y eficaz que el obtenido a pH alcalino, mientras que habían mostrado un efecto similar frente a la fosfatasa alcalina de origen intestinal. Los complejos con azúcares (SacVO, LacVO, TreVO y FruVO) mostraron una acción inhibitoria sobre la FAL ósea muy similar, mientras que para inhibir la FAL intestinal tuvieron un comportamiento muy diferente.

En la tabla I se muestran los parámetros [DI₅₀ y IM₁₀₀] estimados a partir de gráficos similares a los de la figura 2 para los complejos estudiados. Sobre la base de estos datos podemos establecer un orden de potencia y efectividad para inhibir la actividad de fosfatasa alcalina de origen óseo:

InoVO > GolVO \geq VO > ASacVO_{pH:4} \geq SacVO \geq LacVO > FruVO \geq TreVO > ASacVO_{pH:12}.

Como se desprende de los resultados, los complejos de vanadio poseen diferente potencia y efectividad para inhibir fosfatasas de distinto origen. Los alcoholes cíclicos son los más potentes y eficaces inhibidores de la fosfatasa alcalina ósea, sin embargo no lo son para la fosfatasa alcalina intestinal. El TreVO mostró ser el más eficaz inhibidor para la FAL intestinal, mientras que se comportó como un inhibidor moderado de la FAL ósea, entre los diferentes complejos de vanadio(IV) estudiados.

2. Efectos del vanadio sobre la proliferación de osteoblastos UMR106 y MC3T3-E1.

Luego de encontrar que el vanadio inhibe la actividad específica de diferentes fosfatasas, los investigadores comenzaron a diseñar experimentos *in vitro* con células en cultivo para estudiar y conocer sus efectos biológicos. Se encontraron diversas propiedades biológicas y farmacológicas del vanadio, entre ellas las más interesantes son su actividad insulinomimética y antitumoral. Un aspecto importante a tener en cuenta, si consideramos administrar vanadio a pacientes con alguna de estas afecciones, es su distribución en el organismo. El vanadio al ser ingerido por los seres vivos se acumula principalmente en el tejido óseo. Por ello, es de gran interés conocer que tipo de efectos produce el vanadio y sus complejos sobre la proliferación de osteoblastos en cultivo. En el presente trabajo utilizamos dos líneas celulares osteoblásticas (UMR106 y MC3T3-E1) para estudiar diferentes efectos biológicos y farmacológicos del vanadilo y sus complejos.

2.1. Osteoblastos UMR106

En la figura 3 se muestra el efecto del vanadilo(IV) y de tres de sus complejos sobre la proliferación de osteoblastos UMR106. Dependiendo de la concentración, no todos los complejos ensayados estimularon la proliferación. El catión vanadilo(IV), al igual que su complejo con maltosa, fueron promotores del crecimiento de las células UMR106 en concentraciones que van desde 2,5 a 75 μM . El complejo de trehalosa también estimuló la proliferación de estas células, sin embargo lo hizo en un rango de concentraciones mucho menor (2,5 a 10 μM) y luego se comportó como un eficaz inhibidor de la proliferación en el rango de 50 a 100 μM . Por otro lado, el compuesto con sacarosa mostró un efecto inhibitorio en el rango de concentraciones de 25 a 100 μM .

Utilizando el bioensayo del cristal violeta se realizaron curvas dosis – respuesta para todos los derivados de vanadio(IV) estudiados en esta tesis. A partir de estas curvas se estimó la respuesta mitogénica máxima [RM] y el efecto sobre la proliferación a 100 μM [EP₁₀₀]. Los resultados de estos estudios se muestran en la tabla II.

Figura 3. Efectos del vanadio(IV) y sus complejos con trehalosa, sacarosa y maltosa sobre la proliferación de osteoblastos UMR106.

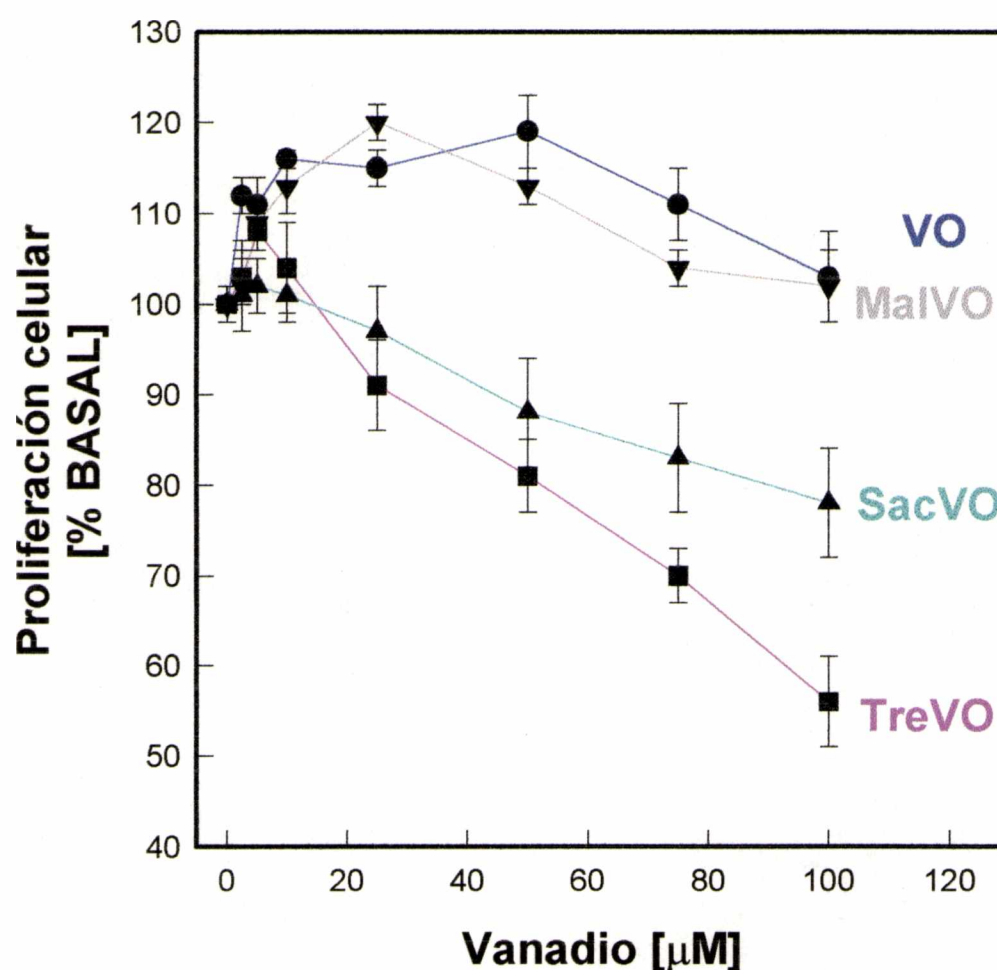


Figura 3: Las células UMR106 fueron subcultivadas en platos de 48 pocillos hasta alcanzar aproximadamente el 60 % de confluencia, luego se ayunaron en DMEM sin suero una noche y se incubaron 24 h en DMEM en presencia de concentraciones crecientes de vanadilo(IV), TreVO y SacVO. La proliferación celular se estimó por medio del bioensayo del cristal violeta. Los resultados se expresan como porcentaje del basal (en ausencia de compuestos de vanadio), media \pm SEM.

Tabla II: Respuesta mitogénica máxima [RM] y efecto sobre la proliferación a 100 μ M [EP₁₀₀]

COMPUESTOS DE VANADIO	CÉLULAS MC3T3-E1			CÉLULAS UMR106		
	RM		EP ₁₀₀	RM		EP ₁₀₀
	% Basal	[μ M]		% Basal	[μ M]	
VO	104 \pm 3,0 NS	5	73 \pm 5,0 p< 0,001	119 \pm 4,0 p< 0,001	25	102 \pm 5,0 NS
GluVO	110 \pm 3,0 p< 0,02	25	88 \pm 3,0 p< 0,002	-	-	65 \pm 3,0 p< 0,001
FruVO	114 \pm 2,0 p< 0,001	25	-	123 \pm 2,5 p< 0,001	25	100 \pm 4,0 NS
MalVO	117 \pm 3,0 p< 0,001	5	65 \pm 4,0 p< 0,001	120 \pm 2,0 p< 0,001	25	102 \pm 4,0 NS
LacVO	-		84 \pm 2,0 p< 0,001	119 \pm 3,0 p< 0,001	10	99 \pm 4,0 NS
SacVO	-		80 \pm 3,0 p< 0,001	102 \pm 3,0 NS	5	78 \pm 6,0 p< 0,001
TreVO	116 \pm 3,0 p< 0,001	10	90 \pm 4,0 p< 0,05	108 \pm 2,0 p< 0,02	10	56 \pm 5,0 p< 0,001
GoIVO	114 \pm 4,0 p< 0,001	10	48 \pm 4,0 p< 0,001	118 \pm 3,0 p< 0,001	2,5	53 \pm 4,0 p< 0,001
SolVO	103 \pm 3,0 NS	5	46 \pm 5,0 p< 0,001	107 \pm 2,0 p< 0,05	5	48 \pm 3,0 p< 0,001
MolVO	103 \pm 2,0 NS	2,5	36 \pm 3,0 p< 0,001	113 \pm 4,0 p< 0,02	2,5	66 \pm 4,0 p< 0,001
InoVO	-		58 \pm 4,0 p< 0,001	126 \pm 4,0 p< 0,001	10	58 \pm 4,0 p< 0,001
ConVO	-		49 \pm 5,0 p< 0,001	124 \pm 3,0 p< 0,001	10	42 \pm 3,0 p< 0,001
AGluVO _{pH: 5}	113 \pm 2,0 p< 0,001	2,5	55 \pm 3,0 p< 0,001	115 \pm 2,0 p< 0,001	25	47 \pm 2,0 p< 0,001
AGluVO _{pH: 12}	120 \pm 4,0 p< 0,001	2,5	86 \pm 2,0 p< 0,001	120 \pm 4,0 p< 0,001	25	110 \pm 3,0 p< 0,02
ASacVO _{pH: 4}	103 \pm 2,0 NS	2,5	40 \pm 6,0 p< 0,001	104 \pm 3,0 NS	2,5	37 \pm 6,0 p< 0,001
AsacVO _{pH: 12}	103 \pm 4,0 NS	10	78 \pm 3,0 p< 0,001	123 \pm 4,0 p< 0,001	25	103 \pm 2,0 NS

Como puede verse, los efectos mitogénicos fueron relativamente débiles, si se los compara con un mitógeno clásico para estas células como por ejemplo la insulina (RM: 150 - 160 % basal de 0,1 - 1 μ M). Sobre la base de estos datos podemos clasificar a los complejos del catión vanadilo(IV) en orden decreciente de efectividad para estimular la proliferación de las células UMR106:

InoVO > ConVO \geq FruVO = ASacVO_{pH: 12} > AGluVO_{pH: 12} = MalVO \geq LacVO = VO \geq GolVO > AGluVO_{pH: 5} \geq MolVO \geq TreVO > SolVO.

Además, podemos clasificarlos sobre la base de su efecto inhibitorio sobre la proliferación de las células UMR106 a 100 μ M en orden decreciente de citotoxicidad:

ASacVO_{pH: 4} > ConVO > AGluVO_{pH: 5} \geq SolVO > GolVO > TreVO \geq InoVO > MolVO > SacVO > FruVO = VO = MalVO = ASacVO_{pH: 12} > AGluVO_{pH: 12}.

2.2. Preosteoblastos MC3T3-E1

El ensayo del cristal violeta se utilizó también para estudiar el efecto mitogénico de los compuestos del catión vanadilo(IV) en células preosteoblásticas MC3T3-E1 en cultivo. Esta línea celular tiene características de preosteoblastos normales, reflejando en mejor medida, lo que podría suceder en el tejido óseo si administráramos vanadio a seres vivos. De la misma manera que para las células UMR106, se seleccionaron tres compuestos de vanadio(IV) para ejemplificar y mostrar la acción mitogénica y el efecto inhibitorio.

Dependiendo de la concentración, solo algunos de ellos estimularon la proliferación. El catión vanadilo(IV) no estimuló la proliferación de las células MC3T3-E1, sin embargo los complejos con trehalosa y maltosa se comportaron como agentes mitogénicos para ésta línea celular en el rango de concentraciones de 2,5 a 25 μ M. El complejo de vanadilo(IV) con maltosa, en concentraciones superiores a 50 μ M, resultó ser más tóxico que el complejo con trehalosa, el cual solo mostró un 10 % de inhibición a 100 μ M. A partir de curvas dosis – respuesta se estimó la respuesta mitogénica máxima y el efecto sobre la proliferación a 100 μ M. Los resultados de estos estudios se muestran en la tabla II.

Figura 4. Efectos del vanadio(IV) y sus complejos con trehalosa y maltosa sobre la proliferación de preosteoblastos MC3T3-E1.

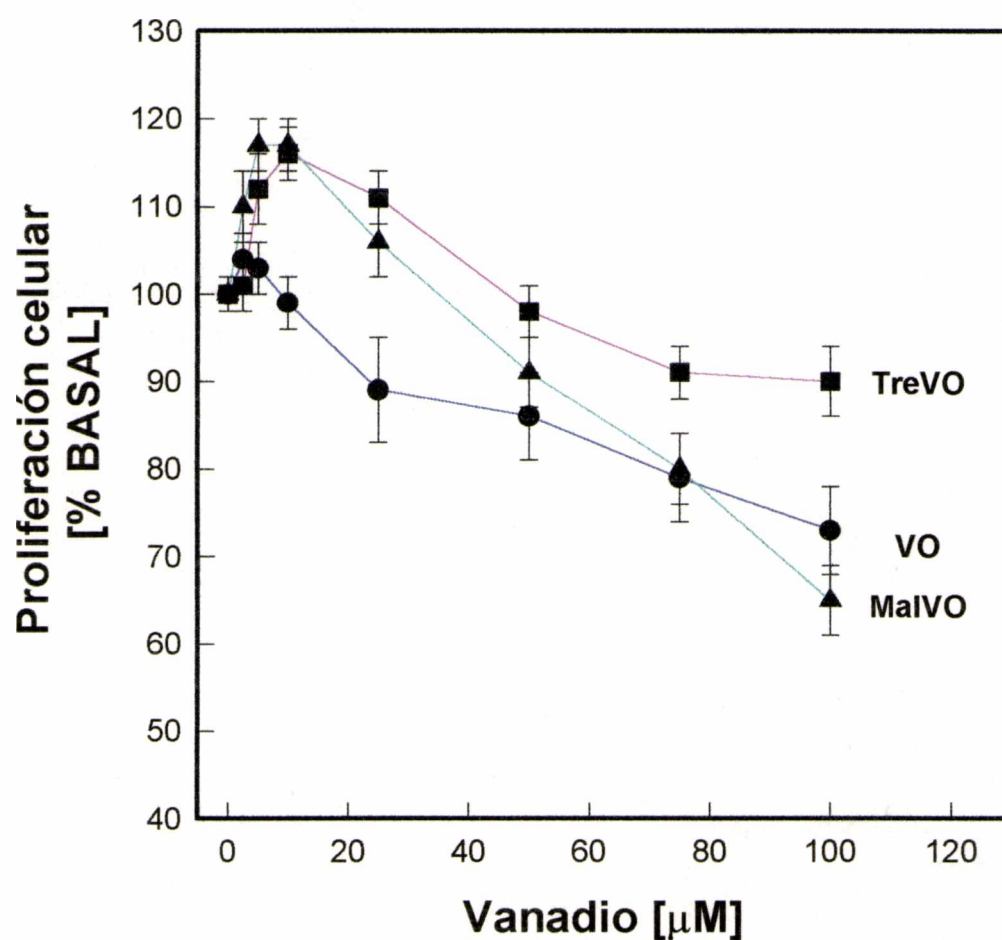


Figura 4. Las células MC3T3-E1 fueron subcultivadas en platos de 48 pocillos hasta alcanzar aproximadamente el 60 % de confluencia, luego se ayunaron en DMEM sin suero una noche y se incubaron 24 h en DMEM en presencia de concentraciones crecientes de vanadilo(IV), TreVO y SacVO. La proliferación celular se estimó por medio del bioensayo del cristal violeta. Los resultados se expresan como porcentaje del basal (en ausencia de compuestos de vanadio), media \pm SEM.

Sobre la base de los datos de la tabla II se puede clasificar a los complejos del catión vanadilo(IV) según su capacidad mitogénica sobre las células MC3T3-E1:

AGluVO_{pH: 12} > MalVO ≥ TreVO ≥ FruVO = GolVO ≥ AGluVO_{pH: 5}

Además y de la misma manera que con las células UMR106, podemos clasificarlos sobre la base de su efecto inhibitorio sobre la proliferación de las células MC3T3-E1 a 100 μM en orden decreciente de citotoxicidad:

ASacVO_{pH: 12} > MolVO > ASacVO_{pH: 4} > SolVO ≥ GolVO ≥ ConVO > AGluVO_{pH: 5} ≥ InoVO > MalVO > VO > SacVO > LacVO ≥ AGluVO_{pH: 12} > TreVO.

3. Efectos del vanadio sobre la diferenciación de los osteoblastos UMR106.

Las células UMR106 son un modelo de osteoblastos diferenciados que expresan, entre otras proteínas, colágeno y fosfatasa alcalina que son utilizadas como marcadores de la diferenciación osteoblástica. Las fosfatasas y PTPasas juegan un papel muy importante en la diferenciación de algunos tipos celulares, como los osteoblastos, y en estos casos el vanadio podría regular la expresión del fenotipo celular al ser un inhibidor de estas enzimas. Para investigar el efecto de diferentes complejos de vanadio sobre la diferenciación osteoblástica determinamos la actividad específica de fosfatasa alcalina y el contenido de colágeno producido por las células UMR106.

3.1. Efectos del vanadio sobre la actividad específica de FAL en osteoblastos UMR106.

Para estudiar la acción de los complejos de vanadio(IV) sobre la actividad específica de fosfatasa alcalina en las células UMR106, se incubaron los osteoblastos (80 % confluentes) en platos de 48 pocillos 24 horas con concentraciones crecientes de los compuestos. La actividad de FAL y el contenido total de proteínas se determinaron por métodos colorimétricos como se describe en materiales y métodos. Los resultados de actividad enzimática se expresaron en nmol *p*-NP / min / mg de proteína.

En la figura 5 se muestra el efecto del vanadilo(IV) y de los complejos de trehalosa y sacarosa sobre la actividad específica de fosfatasa alcalina en las células UMR106. Los tres compuestos de vanadio(IV) inhibieron la actividad específica de la FAL en forma dependiente de la dosis. El vanadilo(IV) y su complejo con sacarosa mostraron potencias (DI_{50}) y eficacias (IM_{100}) comparables, mientras que el de trehalosa fue menos efectivo y potente que los anteriores. En la tabla III se muestran los datos de DI_{50} e IM_{100} obtenidos para los diferentes complejos de vanadilo(IV) estudiados.

Figura 5. Efectos del vanadio y sus complejos con trehalosa y sacarosa sobre la actividad específica de FAL en osteoblastos UMR106.

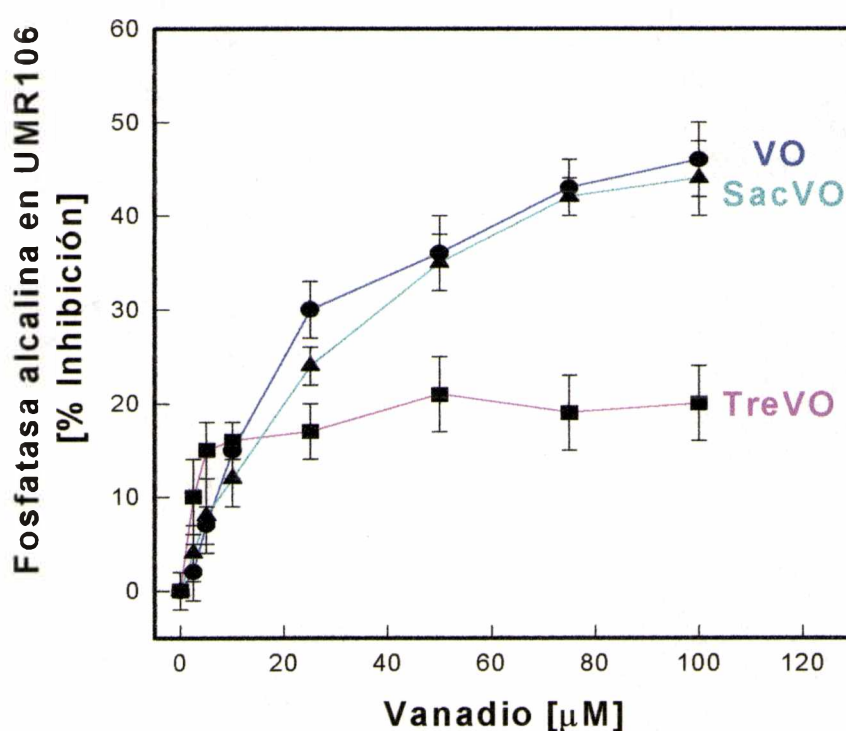


Figura 5. Las células UMR106 fueron subcultivadas en platos de 48 pocillos hasta alcanzar aproximadamente el 80-90 % de confluencia, se ayunaron en DMEM sin suero una noche y luego se

incubaron 24 horas en DMEM en presencia de concentraciones crecientes de vanadilo(IV), TreVO y SacVO. La monocapa celular se solubilizó con 0,1 % de Tritón X100 y se determinó la actividad de FAL. La actividad específica de FAL basal (células no tratadas con compuestos de vanadio) fue de 6 nmol p-NP / 10 min / μ g de proteína. Los resultados se expresan como porcentaje de inhibición de la actividad basal como la media \pm SEM.

Tabla III: Porcentajes de inhibición de FAL de las células UMR106 producida por 100 μ M de compuestos de vanadio(IV) [**IM₁₀₀**] y dosis inhibitoria cincuenta [**DI₅₀**].

DIFERENCIACIÓN CELULAR - FOSFATASA ALCALINA		
COMPUESTOS	DI₅₀ [μM]	IM₁₀₀ [% Inhibición]
VO	> 100	46 \pm 4,0
GluVO	65	58 \pm 5,0
FruVO	> 100	34 \pm 3,0
MalVO	> 100	32 \pm 6,0
LacVO	> 100	36 \pm 5,0
SacVO	> 100	44 \pm 4,0
TreVO	> 100	20 \pm 4,0
GolVO	42	72 \pm 3,0
SolVO	50	62 \pm 5,0
MolVO	50	61 \pm 4,0
InoVO	20	80 \pm 3,0
ConVO	20	71 \pm 4,0
AGluVO _{pH: 5}	90	52 \pm 6,0
AGluVO _{pH: 12}	> 100	36 \pm 5,0
ASacVO _{pH: 4}	40	60 \pm 6,0
ASacVO _{pH: 12}	> 100	30 \pm 6,0

Todos los valores de IM₁₀₀ son altamente significativos ($p < 0,001$). Las diferencias son respecto del basal (6 nmolp-NP / 10 min / μ g de proteína = 100 %)

Todos los compuestos de vanadio(IV) inhibieron la FAL siendo el InoVO el más efectivo de todos a 100 μ M y el TreVO el menos efectivo. El vanadilo al igual que el derivado de sacarosa mostró una eficacia intermedia para inhibir la fosfatasa alcalina en las células UMR106. Si bien todos los complejos del catión vanadilo(IV) inhibieron significativamente la FAL de las células UMR106, la eficacia no fue la misma para todos ellos. A partir de gráficos como el que se muestran en la figura 5 podemos establecer el siguiente orden de eficacia para inhibir la actividad específica de la FAL en las células UMR106:

InoVO > GolVO \geq ConVO > SolVO \geq MolVO \geq ASacVO_{pH: 4} \geq GluVO > AGluVO_{pH: 5} > VO \geq SacVO > LacVO = AGluVO_{pH: 12} \geq FruVO \geq MalVO \geq ASacVO_{pH: 12} > TreVO.

Es interesante mencionar que los complejos con alcoholes fueron los más eficaces y en general se puede decir que se conserva el orden de eficacia encontrado en el ensayo de inhibición de fosfatasa alcalina en los extractos de las células UMR106.

3.2. Efecto del vanadio sobre la producción de colágeno por las células UMR106

Para estudiar la acción de los complejos de vanadio sobre la producción de colágeno por las células UMR106 se utilizó un método histoquímico haciendo uso del colorante Sirius Red.

Figura 6. Efecto del vanadio(IV) y sus complejos de trehalosa y sacarosa sobre la producción de colágeno por las células UMR106

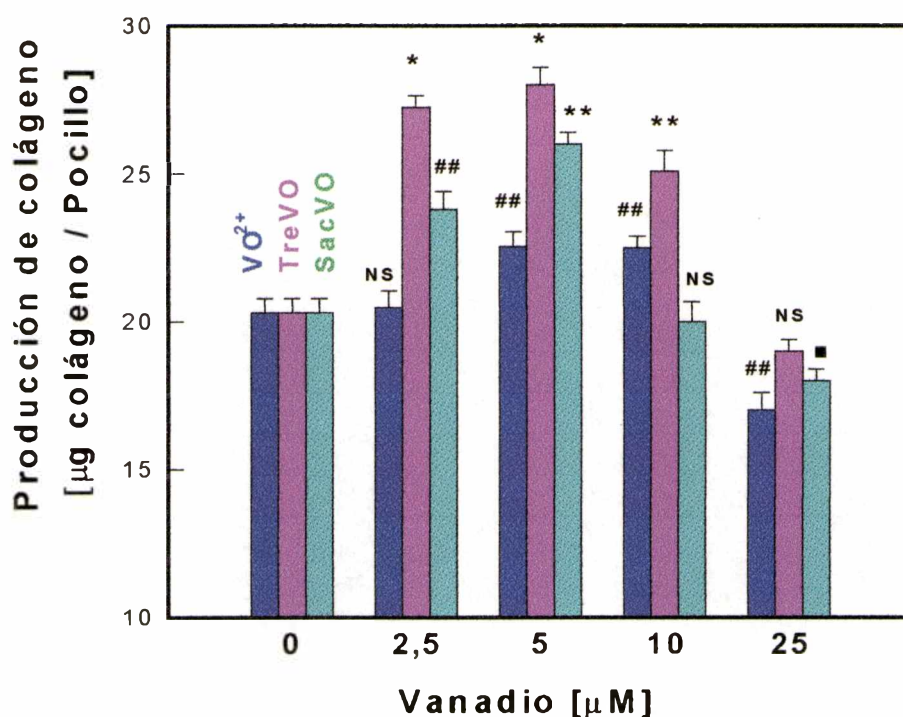


Figura 6. Las células UMR106 fueron subcultivadas en platos de 48 pocillos hasta alcanzar el 100 % de confluencia, se ayunaron en DMEM sin suero una noche y luego se incubaron 48 horas con DMEM en presencia de concentraciones crecientes de vanadilo(IV), TreVO y SacVO. El colágeno producido por las células se coloreó con Sirius Red y el colorante luego se extrajo con una solución de NaOH 0,1 N y se determinó la DO a 550 nm. Las proteínas totales se cuantificaron por el método de Bradford y los resultados se expresaron en μg de colágeno / pocillo, como la media \pm SEM. Las diferencias son

respecto del basal * $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, # $p < 0,002$, ## $p < 0,02$, ■ $p < 0,05$, NS: no significativo.

Cuando las células UMR106 se cultivaron en presencia de complejos de vanadio, la producción de colágeno aumentó significativamente, siendo 5 μM la concentración más eficaz para los tres compuestos estudiados. El complejo con trehalosa estimuló un 140 % respecto del basal ($p < 0,001$) y el complejo con sacarosa un 130 %, también respecto del basal ($p < 0,001$). El vanadilo(IV) mostró el mismo efecto, pero fue menos eficaz que sus complejos (110 % respecto del basal, $p < 0,02$). Altas dosis de estos complejos tienden a inhibir o no producen ningún efecto sobre la producción de colágeno.

3.3. Efecto del vanadio sobre el consumo de glucosa por los osteoblastos.

Gran parte de los efectos biológicos de la insulina son reproducidos por el vanadio en células en cultivo. Se encontró que el vanadato, al igual que la insulina, regula el metabolismo de los hidratos de carbono, los lípidos y las proteínas. Estudios en numerosos tipos celulares muestran que el vanadio incrementa la captación y metabolismo de la glucosa mediante diferentes mecanismos.

Con el objetivo de estudiar el efecto del vanadilo(IV) y sus complejos sobre el consumo de glucosa por los osteoblastos en cultivo utilizamos el método de Okajima el cual es sensible y adecuado para responder algunos de nuestros interrogantes.

Dado que los osteoblastos MC3T3-E1 consumen poca cantidad de glucosa (2 μg / día / pocillo) no fueron incluidos en este tipo de estudios.

Como puede observarse en la figura 7 los compuestos de vanadio estimularon el consumo de glucosa por los osteoblastos en forma similar a la insulina. El máximo efecto se alcanzó a 25 μM , siendo el complejo de trehalosa el más potente y eficaz de todos (132 % Basal, $p < 0,001$). A partir de las curvas dosis - respuesta como las de la Figura 7 se obtuvieron los efectos máximos (**RM**) alcanzados por los distintos complejos del catión vanadilo(IV) los cuales se detallan en la tabla IV.

Figura 7. Efecto de la insulina, el vanadio(IV) y sus complejos de trehalosa y sacarosa sobre el consumo de glucosa por osteoblastos UMR106.

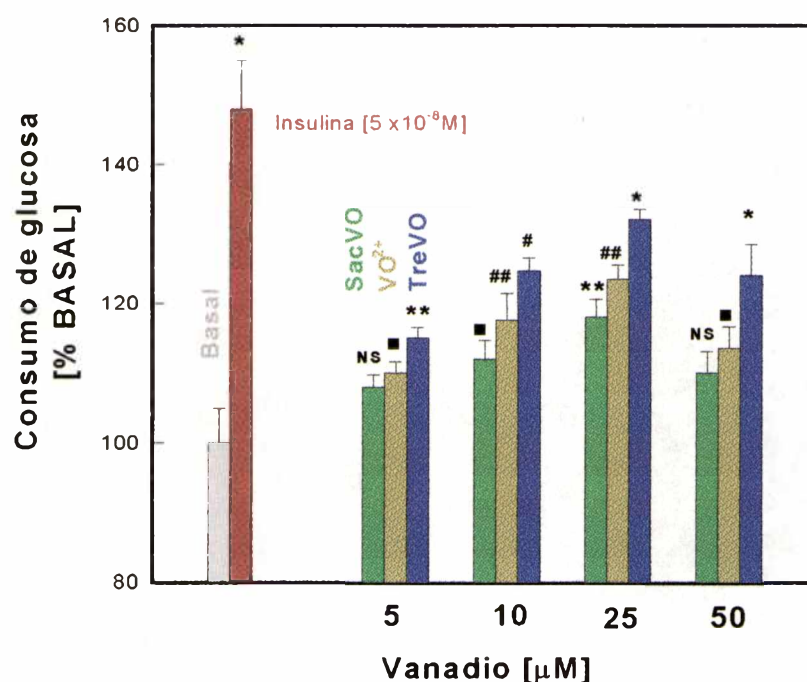


Figura 7. Las células UMR106 fueron subcultivadas en platos de 48 pocillos hasta alcanzar el 100 % de confluencia, se ayunaron en DMEM una noche y luego fueron incubadas de 4 a 6 horas en DMEM en presencia de concentraciones crecientes de vanadilo(IV), TreVO y SacVO. El consumo de glucosa por los osteoblastos se calculó a partir de la glucosa remanente en el medio de cultivo al final de la incubación con los compuestos de vanadio. La glucosa se determinó por el método de la glucosa oxidasa (Kit de Wiener Lab). El consumo basal de glucosa por los osteoblastos fue de aproximadamente 10 $\mu\text{g} / \text{h} / \text{pocillo}$. Los resultados se expresan como porcentaje del basal, media \pm SEM. Las diferencias son respecto del basal * $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, # $p < 0,002$, ## $p < 0,02$, ■ $p < 0,05$, NS: no significativo.

Tabla IV. Efectos máximos de los complejos de vanadio(IV) sobre el consumo de glucosa de osteoblastos UMR106 en cultivo.

CÉLULAS UMR106		
Compuestos de vanadio	RM	
	[% BASAL]	[μ M]
VO	123 \pm 2,0 (p< 0,002)	25
GluVO	118 \pm 2,5 (p< 0,01)	25
FruVO	126 \pm 2,0 (p< 0,001)	25
MalVO	125 \pm 2,3 (p< 0,001)	25
LacVO	124 \pm 1,8 (p< 0,001)	25
SacVO	118 \pm 2,0 (p< 0,01)	25
TreVO	132 \pm 1,5 (p< 0,001)	25
GoIVO	117 \pm 2,0 (p< 0,01)	10
SolVO	102 \pm 2,7 (NS)	10
MolVO	103 \pm 2,3 (NS)	10
InoVO	114 \pm 1,7 (p< 0,01)	10
ConVO	114 \pm 2,3 (p< 0,002)	10
AGluVO _{pH: 5}	112 \pm 2,0 (p< 0,05)	25
AGluVO _{pH: 12}	112 \pm 2,0 (p< 0,05)	25
ASacVO _{pH: 4}	114 \pm 2,6 (p< 0,002)	25
ASacVO _{pH: 12}	112 \pm 2,3 (p< 0,05)	25

Las diferencias estadísticas son respecto del basal. El consumo basal de glucosa por los osteoblastos fue de aproximadamente 10 μ g / h / pocillo.

Es interesante destacar que los complejos de vanadilo(IV) con monosacáridos y disacáridos fueron los más eficaces para estimular el consumo de glucosa. Los complejos con ácidos y alcoholes cíclicos se comportaron como agentes intermedios de la estimulación del consumo de glucosa en las células UMR106, mientras que los complejos con alcoholes lineales no fueron promotores del consumo de glucosa, con excepción del complejo con galactitol.

4. Alteraciones morfológicas

En general el vanadio al igual que otros elementos de transición inducen efectos citotóxicos por encima de ciertas concentraciones. En nuestro modelo evaluamos los efectos tóxicos a través de las alteraciones morfológicas de las células en cultivo. Los cambios morfológicos más importantes, que ocurren como consecuencia de la muerte celular, son debidos tanto a procesos de apoptosis como de necrosis celular. También podemos observar alteraciones en las proteínas del citoesqueleto. En esta serie de estudios utilizamos diferentes técnicas y tinciones para poner de manifiesto algunas de las alteraciones mencionadas.

4.1. Alteraciones morfológicas observadas en la tinción con Giemsa.

Las **células MC3T3-E1** presentan tamaño y forma característicos de fibroblastos normales, observándose conexiones intercelulares, núcleos redondeados y homogéneos con nucleolos en “rueda de carro” y un citoplasma homogéneo.

Figura 8. Células MC3T3-E1 teñidas con Giemsa

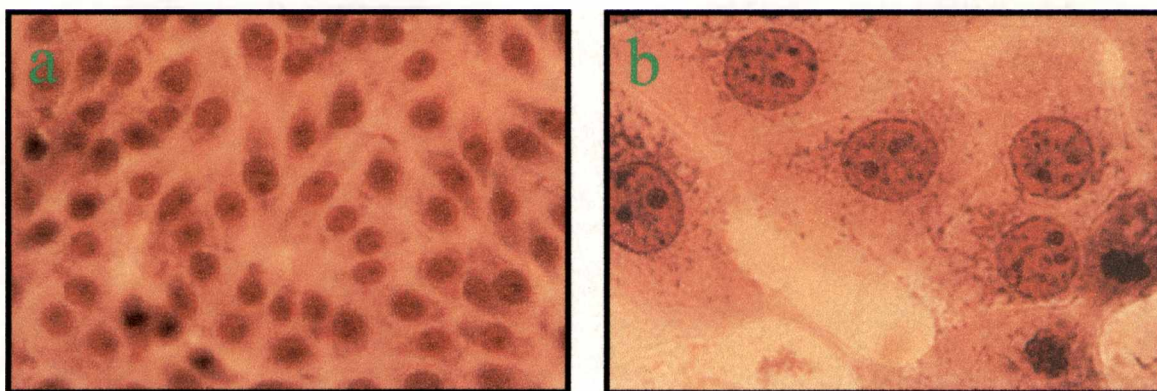


Figura 8. Las células MC3T3-E1 fueron subcultivadas en platos de 6 pocillos y se ayunaron una noche en DMEM sin suero, luego se incubaron 24 h en DMEM. La monocapa celular se fijó con metanol y se coloreó con Giemsa. Las fotos se tomaron con una cámara Olympus adaptada a un microscopio óptico. Objetivos: **a)** 10X y **b)** 63X.

En las figuras 8 a y b se muestran fotos con diferentes aumentos de las células MC3T3-E1 confluentes. En las células coloreadas con Giemsa podemos ver los núcleos redondeados, gran número de conexiones intercelulares y el citoplasma homogéneo y claro. Además, pueden observarse algunas células en proceso de mitosis.

Figura 9. Efecto de TreVO (10 μ M) sobre la morfología de las células MC3T3-E1.

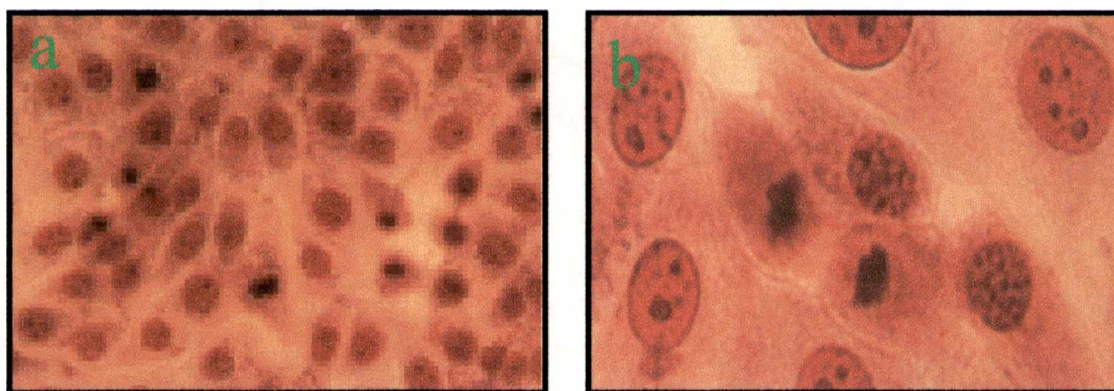


Figura 9. Las células MC3T3-E1 fueron subcultivadas en platos de 6 pocillos y se ayunaron una noche en DMEM sin suero, luego se incubaron 24 h en DMEM con 10 μ M de TreVO. La monocapa celular se fijó con metanol y se coloreó con Giemsa. Las fotos se tomaron con una cámara Olympus adaptada a un microscopio óptico. Objetivos: **a)** 10X y **b)** 63X.

En las figuras 9 a y b se observan células MC3T3-E1 tratadas con 10 μ M de TreVO, esta dosis mitogénica no indujo cambios morfológicos observables. Sin embargo, podemos encontrar más figuras de mitosis que en el control, producto del efecto del derivado de vanadio sobre la proliferación. Por el contrario, altas concentraciones del complejo (100 μ M) produjeron cambios morfológicos importantes, asociados con su toxicidad. En la figura 10 a y b se muestran células MC3T3-E1 tratadas con 100 μ M de TreVO. Puede observarse que hay

un menor número de células por campo que en el control o que en el caso de las tratadas con 10 μ M del complejo, disminuyeron las conexiones intercelulares, los núcleos han modificado su forma y tamaño y el citoplasma está más condensado.

Figura 10. Efecto de TreVO (100 μ M) sobre la morfología de las células MC3T3-E1.

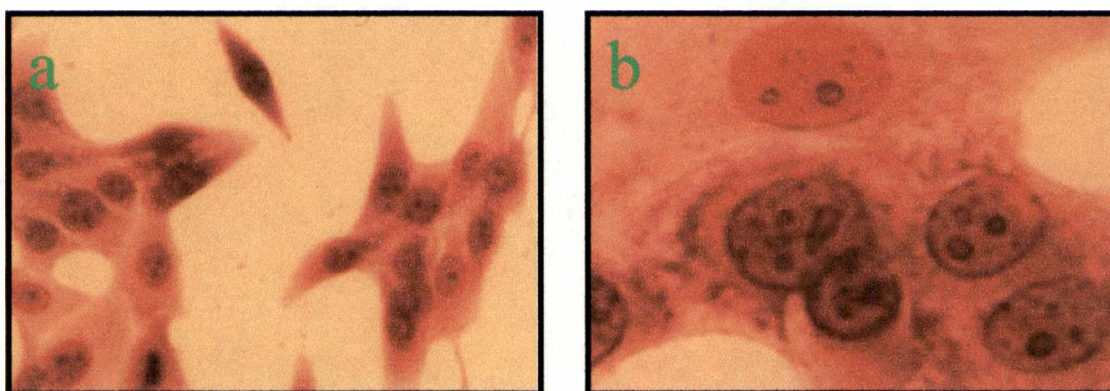


Figura 10. Las células MC3T3-E1 fueron subcultivadas en platos de 6 pocillos y se ayunaron una noche en DMEM sin suero, luego se incubaron 24 h en DMEM con 100 μ M de TreVO. La monocapa celular se fijó con metanol y se coloreó con Giemsa. Las fotos se tomaron con una cámara Olimpus adaptada a un microscopio óptico. Objetivos: **a)** 10X y **b)** 63X..

Las **células UMR106** muestran un fenotipo transformado, característico de células tumorales con una mayor relación núcleo / citoplasma, en general son más grandes que las MC3T3-E1 y también poseen gran número de conexiones intercelulares con núcleos grandes y arriñonados (Fig. 11).

Figura 11. Células UMR106 teñidas con Giemsa

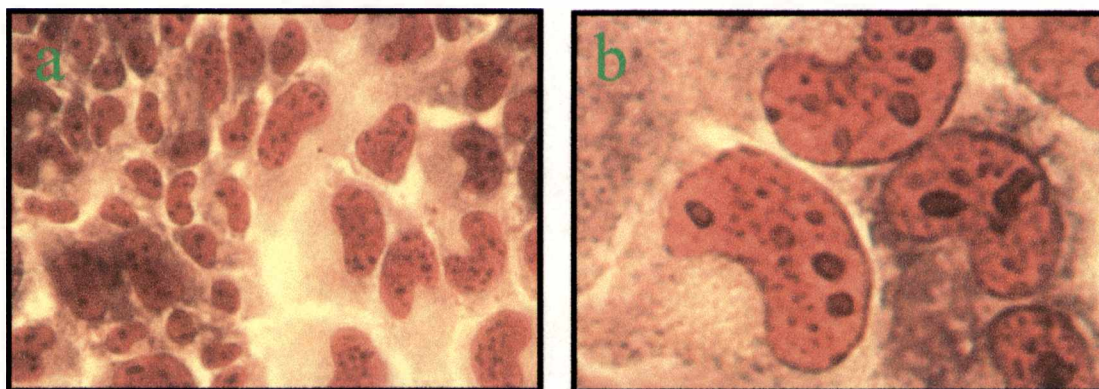


Figura 11. Las células UMR106 fueron subcultivadas en platos de 6 pocillos y se ayunaron una noche en DMEM sin suero, luego se incubaron 24 h en DMEM. La monocapa celular se fijó con metanol y se coloreó con Giemsa. Las fotos se tomaron con una cámara Olympus adaptada a un microscopio óptico. Objetivos: **a)** 10X y **b)** 63X.

Las células UMR106 tratadas con bajas dosis de TreVO muestran una morfología similar a las controles (Fig. 12). Podemos observar algunas figuras de mitosis, núcleos característicos y gran número de conexiones intercelulares.

Figura 12. Efecto de TreVO (10 μ M) sobre la morfología de las células UMR106.

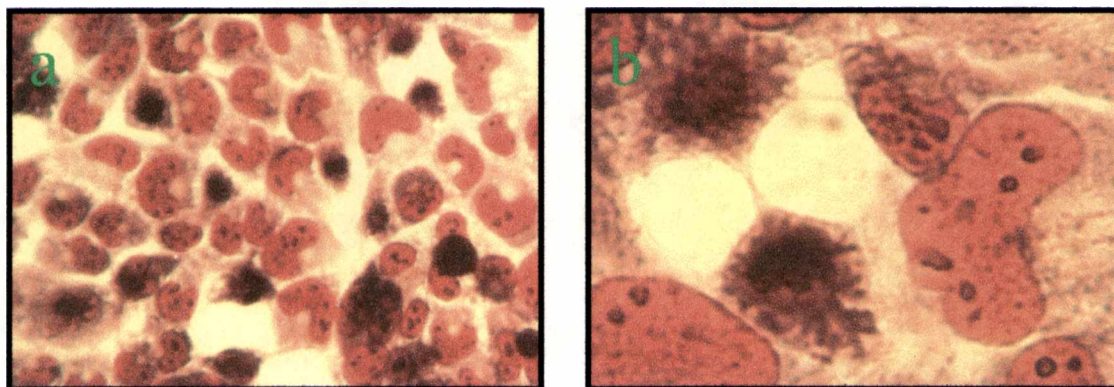


Figura 12. Las células UMR106 fueron subcultivadas en platos de 6 pocillos y se ayunaron una noche en DMEM sin suero, luego se incubaron 24 h en DMEM con 10 μ M de TreVO. La monocapa celular se fijó con metanol y se coloreó con Giemsa. Las fotos se tomaron con una cámara Olympus adaptada a un microscopio óptico. Objetivos: **a)** 10X y **b)** 63X.

Figura 13. Efecto de TreVO (100 μ M) sobre la morfología de las células UMR106.

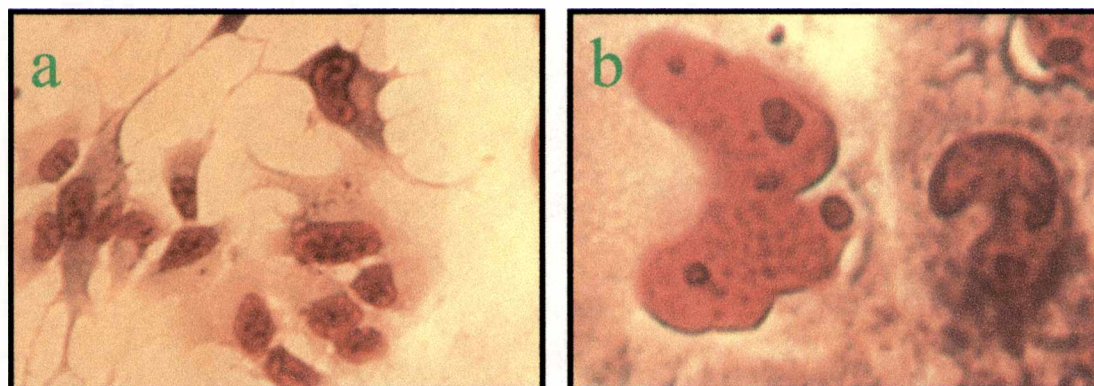


Figura 13. Las células UMR106 fueron subcultivadas en platos de 6 pocillos y se ayunaron una noche en DMEM sin suero, luego se incubaron 24 h en DMEM con 100 μ M de TreVO. La monocapa celular se fijó con metanol y se coloreó con Giemsa. Las fotos se tomaron con una cámara Olympus adaptada a un microscopio óptico. Objetivos: **a)** 10X y **b)** 63X.

Los osteoblastos tratados con 100 μ M de TreVO muestran una morfología muy diferente a la del control, los núcleos han cambiado de tamaño y forma, el citoplasma está muy condensado y el número de células por campo es mucho menor. Se observan células con núcleos fraccionados y alterados, característicos de procesos apoptóticos. Las células UMR106 mostraron ser más sensibles al TreVO que las células MC3T3-E1.

4.2. Inmunofluorescencia

Las alteraciones del citoesqueleto son un buen parámetro para estudiar la toxicidad de diferentes drogas. Los cambios en el balance y redistribución de las proteínas del citoesqueleto luego de la exposición a compuestos de vanadio pueden ser detectadas por

microscopía de inmunofluorescencia. El citoesqueleto es una estructura de filamentos que contribuye a la integridad de la célula y, entre otras funciones, define la forma celular. Los haces de filamentos de actina se encuentran en los fibroblastos formando las denominadas fibras de estrés y poseen gran importancia en todos los procesos de adhesión celular. Las células MC3T3-E1 necesitan adherirse a superficies de colágeno, fibronectina, vidrio o plástico para proliferar y diferenciarse.

Para estudiar el efecto de TreVO sobre las proteínas del citoesqueleto incubamos las células en presencia de 10 y 100 μM del complejo y luego estudiamos las fibras de estrés por inmunofluorescencia.

Figura 14. Células MC3T3-E1 coloreadas con FITC-Paloidina para observar las fibras de estrés.

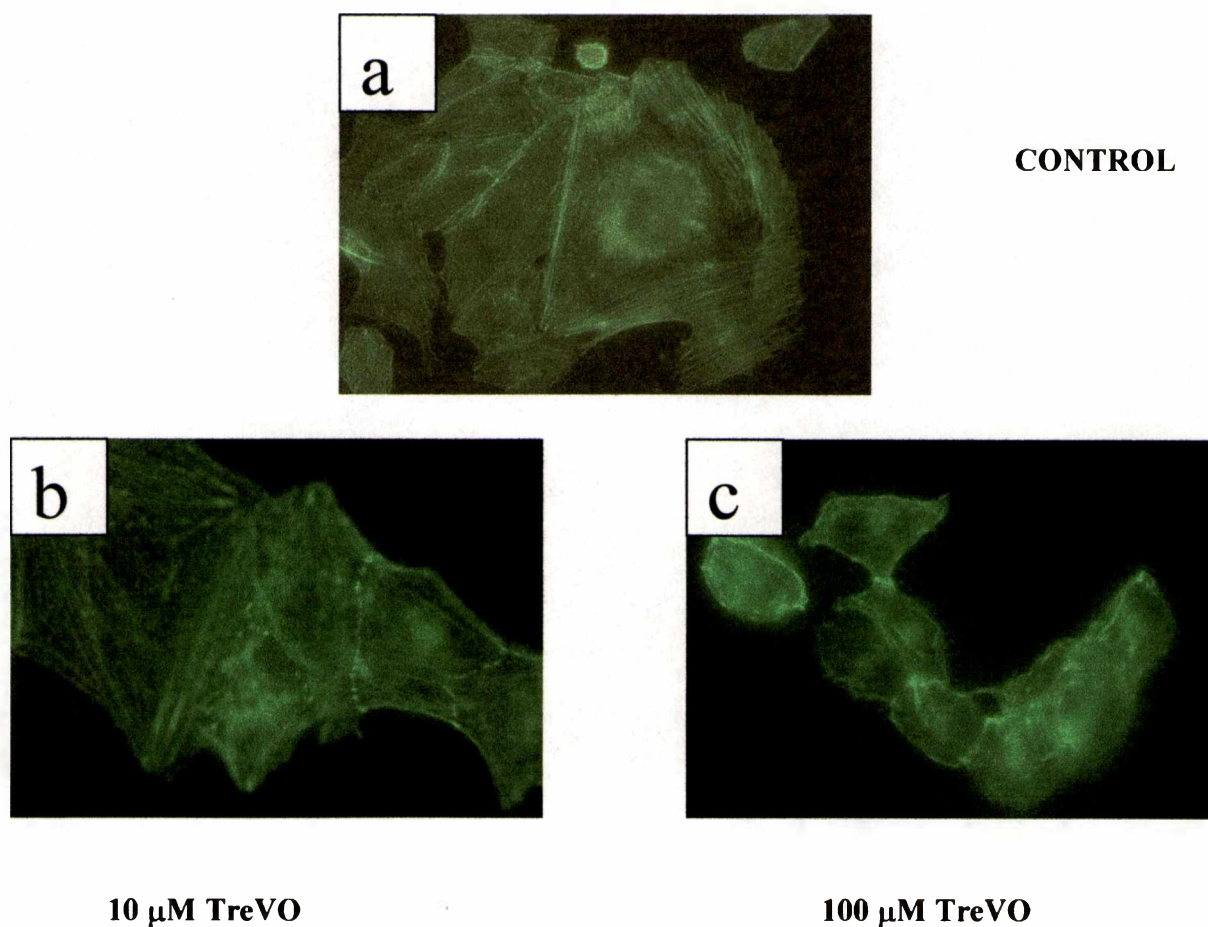


Figura 14. Las células MC3T3-E1 fueron subcultivadas en platos de 6 pocillos sobre cubreobjetos de vidrio y se ayunaron una noche en DMEM sin suero, luego se incubaron 24 h en DMEM con 100 μ M de TreVO. Las células se fijaron con *p*-formaldehído y las fibras de actina se evidenciaron con Palloidina (1:100). Los objetivos de las fotos son de 100 X.

Como puede verse en la figura 14a las células MC3T3-E1 presentan una distribución uniforme de fibras de actina determinando la forma características de éstas células. Las células incubadas con 10 μ M de TreVO (Fig. 14b) no mostraron cambios en la distribución, contenido y forma de las fibras de estrés, sugiriendo que dosis mitogénicas del complejo no causan efectos tóxicos observables. Cuando las células fueron incubadas con 100 μ M de TreVO (fig. 14c) las fibras de actina se tornaron más intensas y modificaron su distribución alterando la morfología celular.

5. Efectos del complejo de vanadio(IV) con trehalosa sobre el desarrollo osteoblástico de las células MC3T3-E1

Como ya fue mencionado, el vanadio al ser ingerido por los seres vivos se acumula principalmente en hueso, por lo tanto es de gran interés conocer qué efectos biológicos producen los complejos de vanadio sobre el desarrollo óseo. En este sentido, las células MC3T3-E1 en cultivo son un modelo *in vitro* adecuado para este tipo de estudios.

Esta línea de células, derivadas de calvaria de ratón, es un modelo de preosteoblastos que pueden diferenciarse a lo largo del cultivo en osteoblastos que alcanzan diferentes estadios de maduración en presencia de AA y β -GP. La diferenciación a osteoblastos comienza a detectarse a las dos semanas de cultivo, expresan proteínas relacionadas con el osteoblasto maduro, incluyendo, entre otras, la producción de FAL y la acumulación de colágeno en la matriz extracelular.

Como ya se describió, el complejo del catión vanadilo(IV) con trehalosa estimula la proliferación de las células MC3T3-E1 en dosis que van desde 5 a 25 μ M en ensayos de 24 h. Debido a que realizamos estudios prolongados, decidimos utilizar la menor dosis efectiva en la inducción de la proliferación para llevar a cabo este tipo de estudios. Además, incluimos un control con AA y β -GP como agentes inductores de la diferenciación de esta línea celular. Se subcultivaron células MC3T3-E1 en platos de 24 pocillos con DMEM suplementado con 10 % de suero bovino fetal (FBS); una vez que las células alcanzaron la confluencia, se renovó el medio de cultivo cada dos días. Las condiciones de ensayo fueron tres: DMEM / 10 % FBS (**Basal**), DMEM / 10 % FBS / 5 μ M complejo de vanadilo (**TreVO**) y DMEM / 10 % FBS / 140 μ M ácido ascórbico / 5 mM β -glicerolfosfato (**AA + β -GP**). A intervalos de tiempo programados se determinó el número de células, contenido de proteínas y colágeno y consumo de glucosa. En otro ensayo, se estudió el efecto de 5 μ M de TreVO sobre la mineralización producida por AA y β -GP.

5.1. Proliferación celular

Figura 15. Efecto de TreVO sobre la proliferación de células MC3T3-E1 en función del tiempo de cultivo.

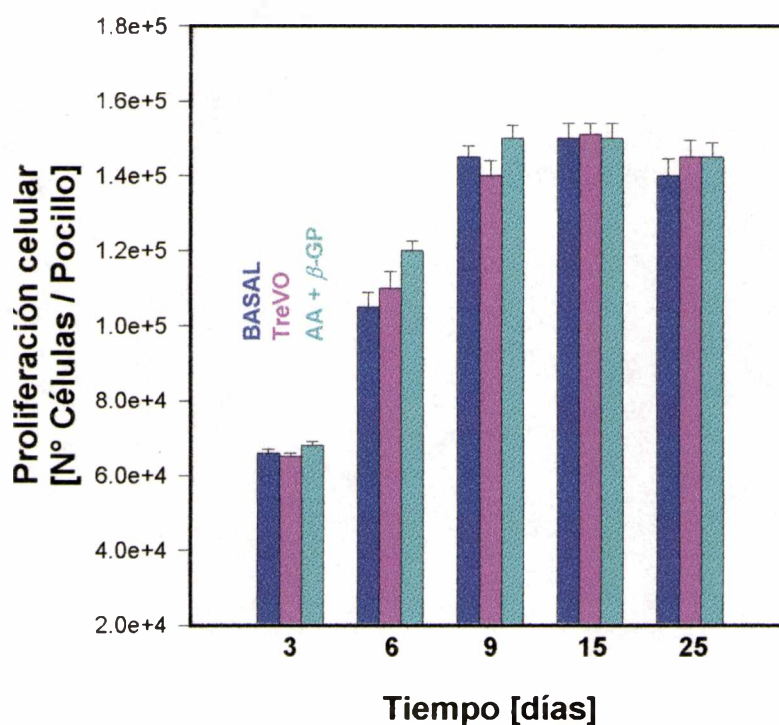


Figura 15. Las células MC3T3-E1 fueron subcultivadas en platos de 24 pocillos e incubadas diferentes periodos de tiempo. El medio de cultivo se cambió cada dos días con DMEM / 10 % FBS (**BASAL**), DMEM / 10 % FBS / 5 μ M TreVO (**TreVO**) ó DMEM / 10 % FBS / 140 μ M ácido ascórbico / 5 mM β -glicerolfosfato (**AA + β -GP**). La proliferación celular se estimó por medio del bioensayo del cristal violeta. Los resultados se expresan en número de células por pocillo, media \pm SEM.

Como puede observarse en la figura 15, las células crecen y se multiplican hasta aproximadamente el día 9 de cultivo para luego mantenerse constante en número a lo largo del tiempo. No se observaron diferencias significativas en el contenido de células para las diferentes condiciones de cultivo para igual periodo de tiempo, excepto a los 6 días para la condición que contiene AA + β -GP, que resultó levemente superior al basal (110 %, $p < 0,05$).

5.2. Diferenciación de las células MC3T3-E1. Actividad específica de FAL, contenido de proteínas totales y colágeno.

Figura 16a. Efecto de TreVO sobre la producción de proteínas totales en células MC3T3-E1 en función del tiempo de cultivo.

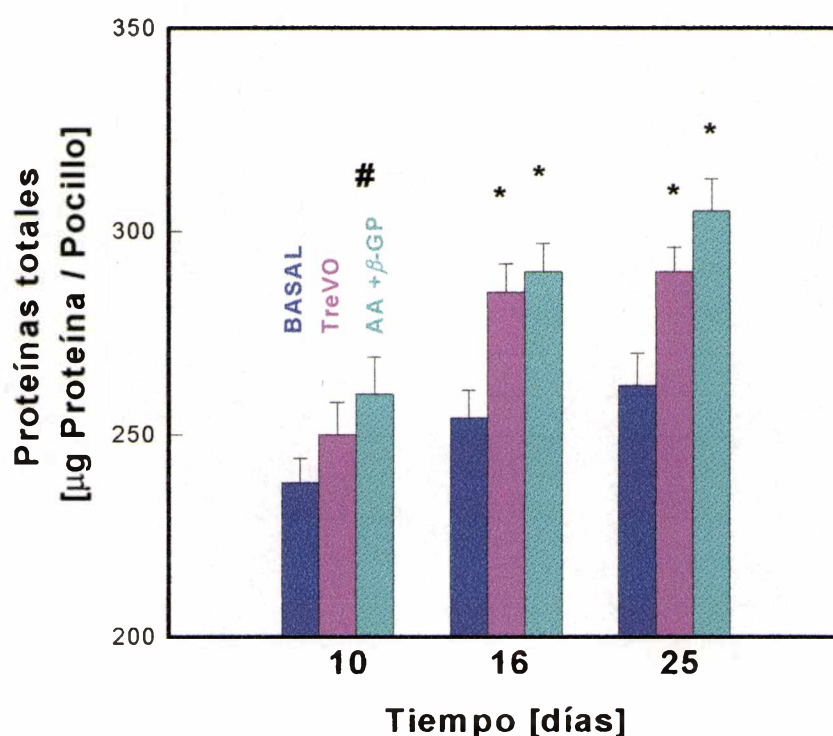


Figura 16a. Las células MC3T3-E1 fueron subcultivadas en platos de 24 pocillos e incubadas diferentes periodos de tiempo. El medio se renovó cada dos días con DMEM / 10 % FBS (**BASAL**), DMEM / 10 % FBS / 5 μ M TreVO (**TreVO**) ó DMEM / 10 % FBS / 140 μ M ácido ascórbico / 5 mM β -glicerolfosfato (**AA + β -GP**). La monocapa de células se solubilizó con 0,1 % Tritón X100 y el contenido de proteínas totales se determinó en el extracto celular por el método de Bradford. Los resultados se expresan como porcentaje del basal, media \pm SEM. Las diferencias son respecto del basal para el mismo período de tiempo. # $p < 0,05$ * $p < 0,001$.

En la figura 16a se muestra el contenido de proteínas totales en función de los días de cultivo. A los diez días el contenido de proteínas es muy similar para cada una de las condiciones, excepto para la mezcla de AA y β -GP donde fue levemente mayor que el basal (110 % respecto del basal, $p < 0,05$); sin embargo, a los 16 días se observó un aumento significativo en el contenido de proteínas luego de la incubación con TreVO y AA y β -GP.

Figura 16b. Efecto de TreVO sobre la producción de colágeno por las células MC3T3-E1 en función del tiempo de cultivo.

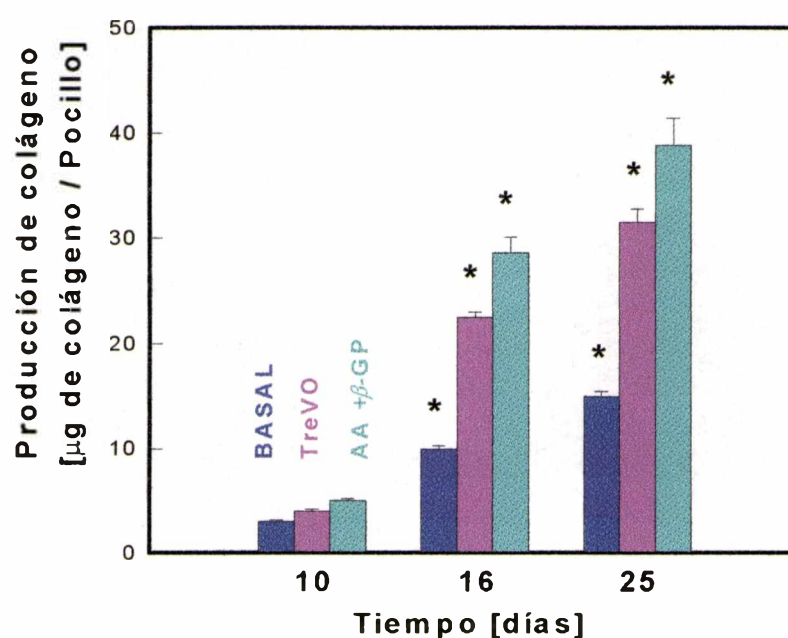


Figura 16b. Las células MC3T3-E1 fueron subcultivadas en platos de 24 pocillos e incubadas diferentes periodos de tiempo. El medio se renovó cada dos días con DMEM / 10 % FBS (**BASAL**), DMEM / 10 % FBS / 5 μ M TreVO (**TreVO**) ó DMEM / 10 % FBS / 140 μ M ácido ascórbico / 5 mM β -glicerolfosfato (**AA + β -GP**). El colágeno producido por las células se coloreó con Sirius Red y el colorante luego se extrajo con solución de NaOH 0,1 N y se determinó la DO a 550 nm. Previamente se determinó que el contenido de colágeno y la DO correlacionan linealmente ($r^2 = 0,998$). Los resultados se expresaron en μ g de colágeno / pocillo, media \pm SEM. Las diferencias son respecto del período anterior, para cada una de las condiciones (* $p < 0,001$).

La mezcla de AA y β -GP es promotora de la producción de colágeno en esta línea celular. El complejo TreVO también indujo un aumento en la producción de colágeno en las células MC3T3-E1 al cabo de 15 – 25 días de cultivo (Fig 16b). Además, puede observarse que la producción basal de colágeno aumenta significativamente a lo largo de los 25 días de cultivo.

Figura 16c. Efecto de TreVO sobre la actividad específica de FAL en células MC3T3-E1.

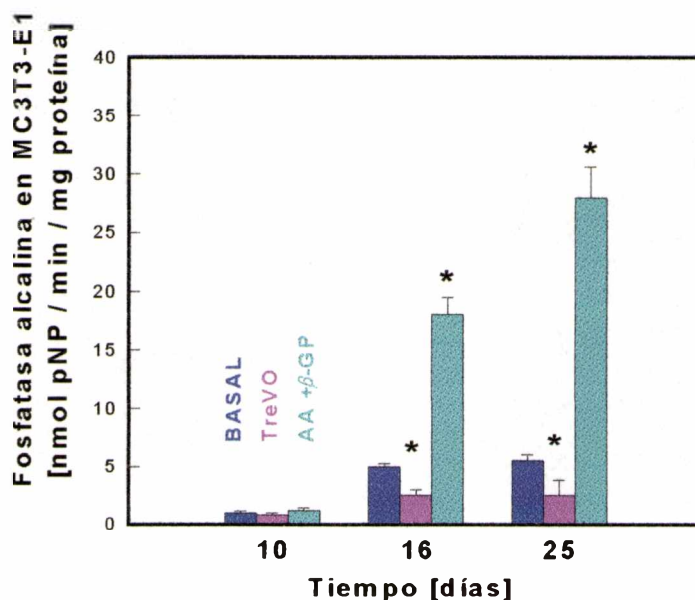


Figura 16c. Las células MC3T3-E1 fueron subcultivadas en platos de 24 pocillos e incubadas diferentes periodos de tiempo. El medio se renovó cada dos días con DMEM / 10 % FBS (**BASAL**), DMEM / 10 % FBS / 5 μ M TreVO (**TreVO**) ó DMEM / 10 % FBS / 140 μ M ácido ascórbico / 5 mM β -glicerolfosfato (**AA + β -GP**). La monocapa de células se solubilizó con 0,1 % Tritón X100 y el contenido de proteínas totales se determinó en el extracto celular por el método de Bradford. La actividad de FAL se determinó en solución reguladora de glicina pH= 10,5 con *p*-NPP como sustrato. La actividad específica basal de FAL fue de 2 nmol *p*-NP / min / mg de proteína. Los resultados se expresan porcentaje del basal, media \pm SEM. Las diferencias son respecto del basal para cada periodo de tiempo (* $p < 0,001$).

En la figura 16c se muestra el efecto del TreVO y la mezcla de AA + β -GP sobre la actividad específica de FAL en los extractos de MC3T3-E1. La mezcla AA + β -GP estimula la diferenciación de esta línea celular induciendo la síntesis de colágeno (Fig 16b) y la actividad de FAL (Fig 16c). Sin embargo, TreVO inhibió parcialmente la actividad de fosfatasa alcalina (Fig 16c), mientras que se comportó como un agente estimulante de la producción de colágeno para estas células.

5.3. Consumo de glucosa

Como puede verse en la figura 17 el consumo de glucosa basal por las células MC3T3-E1 aumenta significativamente entre los 10 y 16 días de cultivo para luego mantenerse constante entre los 16 y 25 días. El agregado de AA y β -GP al medio de cultivo estimuló significativamente el consumo de glucosa (48 μ g / 8h / pocillo) en células diferenciadas durante 16 días de cultivo. Este efecto se mantuvo durante el periodo de mineralización (25 días de cultivo). El complejo de trehalosa también estimuló significativamente el consumo de glucosa luego de 16 días de cultivo (42 μ g / 8h / pocillo) y 45 μ g / 8h / pocillo a los 25 días de cultivo. El consumo de glucosa basal a los 10 días fue muy bajo (2 μ g / 8h / pocillo), sin embargo se incremento significativamente a los 16 días (32 μ g / 8h / pocillo) para luego mantenerse constante.

Figura 17. Efecto de TreVO sobre el consumo de glucosa por las células MC3T3-E1 en función del tiempo de cultivo.

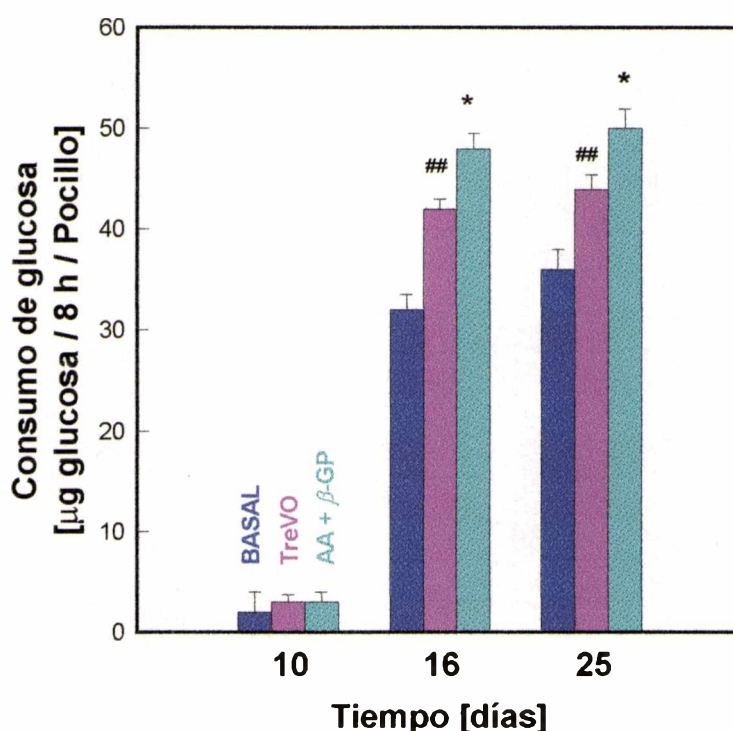


Figura 17. Las células MC3T3-E1 fueron subcultivadas en platos de 24 pocillos e incubadas diferentes períodos de tiempo. El medio se renovó cada dos días con DMEM / 10 % FBS (**BASAL**), DMEM / 10 % FBS / 5 µM TreVO (**TreVO**) ó DMEM / 10 % FBS / 140 µM ácido ascórbico / 5 mM β-glicerolfosfato (**AA + β-GP**). El consumo de glucosa por los osteoblastos se calculó a partir de la glucosa remanente en el medio de cultivo luego de 8 h de incubación para las tres condiciones de cultivo. La glucosa se determinó por el método de la glucosa oxidasa (Kit de Wiener Lab). Los resultados se expresan en µg de glucosa consumidos / 8 h / pocillo, media ± SEM. Las diferencias son respecto del basal para cada período de tiempo (* $p < 0,001$; ## $p < 0,02$).

5.4. Mineralización

Figura 18. Efecto de TreVO sobre la mineralización de las células MC3T3-E1.

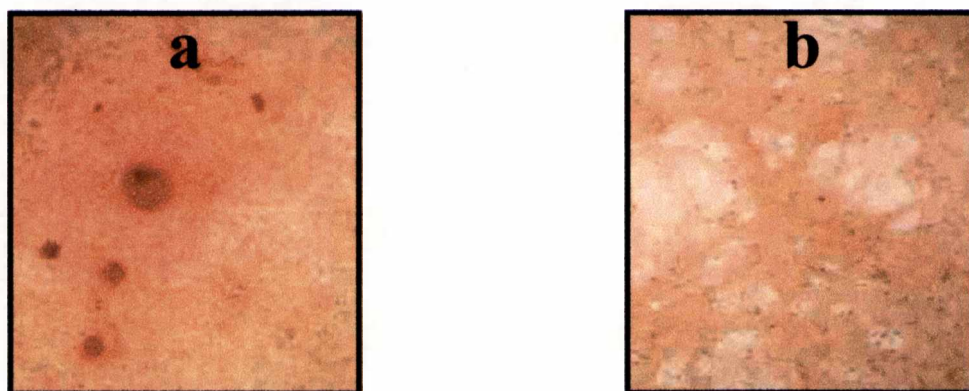


Figura 18. Las células MC3T3-E1 fueron subcultivadas en platos de 24 pocillos e incubadas durante 25 días con DMEM / 10 % FBS / 140 μ M ácido ascórbico / 5 mM β -glicerolfosfato, las condiciones de cultivo fueron dos: a) con 5 μ M de TreVO y b) sin el agregado del complejo. El medio se renovó cada dos días y al finalizar el período de cultivo la monocapa celular se fijó y se coloreó con rojo de alizarina para evidenciar los nódulos de mineralización. Las fotos se registraron con una cámara digital adaptada al microscopio. Obj 10 X

La exposición de las células MC3T3-E1 a 5 μ M de TreVO por 25 días (fig. 18a) indujo la formación de un mayor número de nódulos de mineralización como pudo evidenciarse a través de la coloración con rojo de alizarina. Además, no se observaron signos de toxicidad asociados con la incubación crónica de los osteoblastos con 5 μ M del complejo.

6. MECANISMOS DE ACCIÓN

El mecanismo de acción por el cual el vanadio ejerce sus efectos insulinomiméticos y antitumorales es actualmente de gran interés para muchos investigadores. Estudios *in vitro* e *in vivo* demostraron que el vanadio interviene en diferentes pasos de la vía de transducción de señales de la insulina; además, participaría en algunos puntos de control del ciclo celular. Los efectos biológicos del vanadio podrían ser el resultado de su comportamiento como análogo del fosfato, estimulando la fosforilación de proteínas en restos de tirosina a través de la inhibición de PTPasas. Otra hipótesis alternativa es que el vanadilo(IV) participa de reacciones de oxidación, convirtiéndose en vanadato y produciendo peróxido de hidrógeno el cual fue sugerido como un “segundo mensajero” de la acción insulínica, probablemente al inhibir PTPasas.

La insulina estimula la fosforilación de proteínas en restos de tirosina en células en cultivo, el vanadio también produciría el mismo efecto, pero con algunas diferencias. Se describió que el vanadilo(IV) induce la activación de quinasas de la vía de transducción de señales utilizada por la insulina posteriores al IR y el IRS-1, tales como las MAPKs y la PI3K.

Para tratar de entender los mecanismos de acción utilizados por el vanadio y las vías que activa, estudiamos la fosforilación de proteínas en restos de tirosina inducidas por el complejo TreVO. Para ello, se cultivaron células UMR106 y MC3T3-E1 en platos de 6 pocillos hasta alcanzar la confluencia. Se ayunaron en DMEM sin suero durante una noche y luego se incubaron con concentraciones crecientes de TreVO por diferentes períodos de tiempo. Las proteínas de los extractos celulares en solución reguladora de Laemmli se separaron por electroforesis y se examinaron por *Western blot* con anticuerpos específicos para proteínas fosforiladas en restos de tirosina, fosfo ERKs y ERKs.

Figura 19. Efecto del TreVO sobre la fosforilación de proteínas en restos de tirosina.

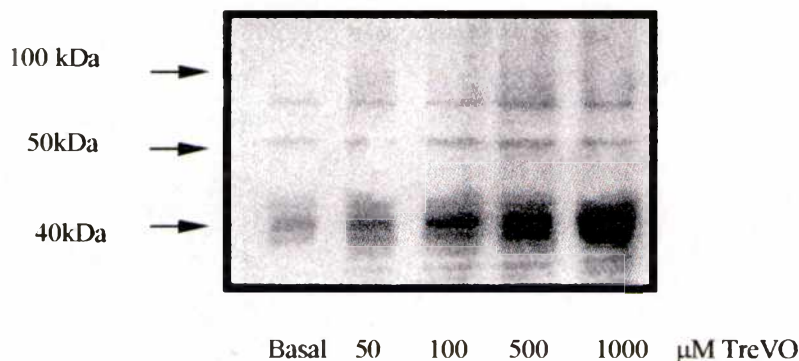


Figura 19. Las células MC3T3-E1 fueron subcultivadas en platos de 6 pocillos hasta alcanzar el 100 % de confluencia y ayunadas una noche en DMEM sin suero. Luego se incubaron 1 hora con dosis crecientes de TreVO. Se determinó el contenido de proteínas por el método de Bradford y se sembraron 30 μ g de proteína por calle del gel. Los extractos celulares en solución reguladora de Laemmli fueron sometidos a electroforesis y las proteínas transferidas luego a un papel de nitrocelulosa. Las fosfoproteínas se detectaron con un anticuerpo específico para fosfotirosina (dilución 1:1000) y se revelaron por electroquimioluminiscencia.

En la figura 19 se muestra un *immunoblot* representativo de células MC3T3-E1 incubadas 1 h con concentraciones crecientes de TreVO. El complejo de vanadio estimula la fosforilación de diferentes proteínas fosforiladas en restos de tirosina en una forma dependiente de la dosis. Se observa una banda alrededor de los 40 kDa más intensa y sensible que el resto. El mismo ensayo se llevó a cabo con células UMR106 observándose una respuesta similar. La diferencia entre ambos *immunoblots* fue la mayor intensidad de las bandas de las células UMR106, probablemente debido a su carácter tumoral.

La banda cercana a los 40 kDa estimamos que podría ser de las ERKs, por ello, repetimos el ensayo e incubamos con anticuerpos específicos para fosfo ERKs y ERKs. Los resultados se muestran en la figura 20.

Figura 20. Efecto de diferentes concentraciones de TreVO sobre la fosforilación de las ERKs en células MC3T3-E1 y UMR106.

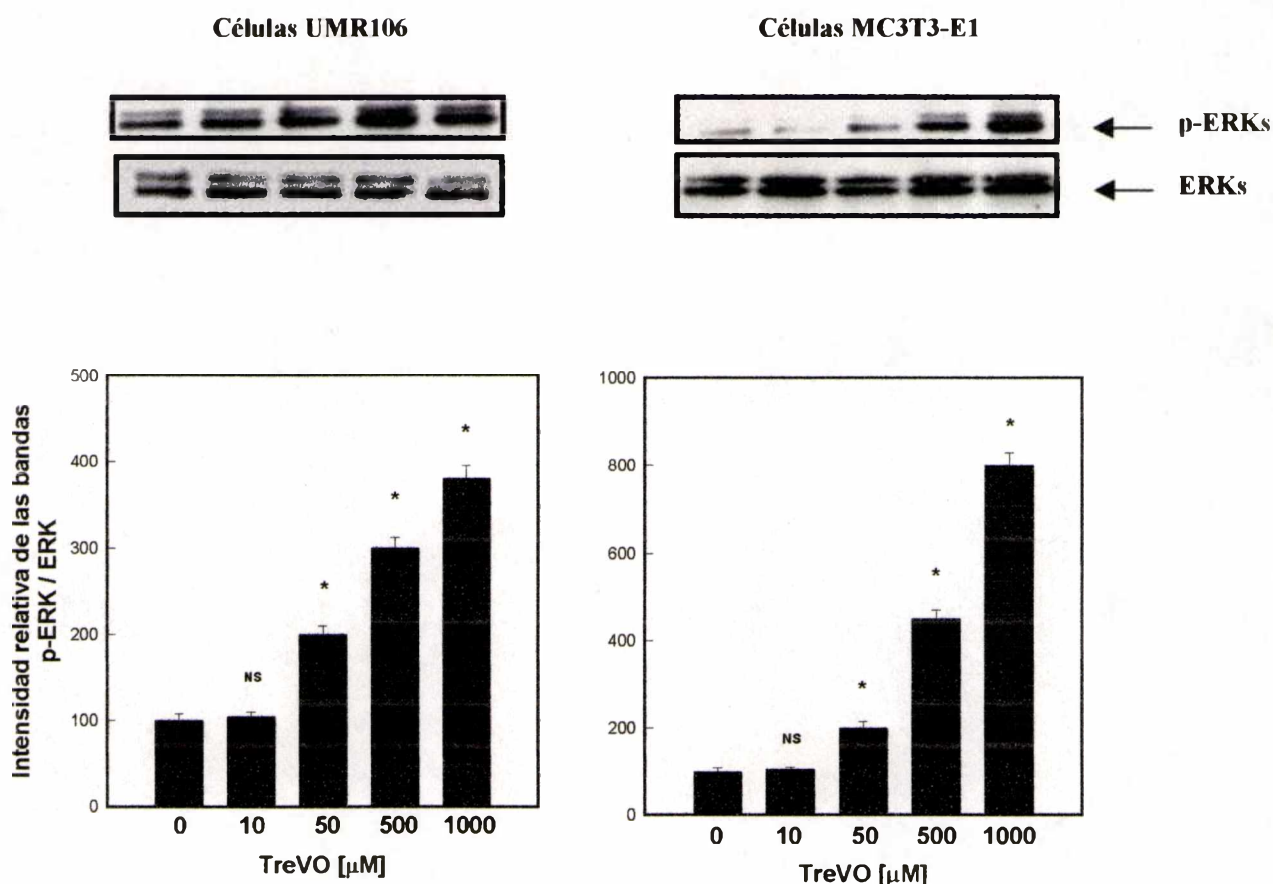


Figura 20. Las células MC3T3-E1 y UMR106 fueron subcultivadas en platos de 6 pocillos hasta alcanzar el 100 % de confluencia y ayunadas una noche en DMEM sin suero. Luego se incubaron 1 hora con diferentes concentraciones de TreVO. Las proteínas se detectaron con anticuerpos específicos para fosfo-EKRs y ERKs (dilución 1:1000 para los extractos de MC3T3-E1 y 1:5000 para los de las UMR106), el segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa se diluyó 1:1000. Las áreas relativas porcentuales (p -ERKs / ERKs) de las bandas se muestran en el gráfico de barras. Los valores son: media \pm SEM. Las diferencias son respecto del basal (* $p < 0,001$; NS: no significativo).

Como puede observarse en la figura 20 el complejo de trehalosa indujo la fosforilación de las ERKs en una forma dependiente de la dosis en ambas líneas celulares. La característica más importante que diferencia a ambos *immunoblots* es la intensidad basal de las bandas. Las células UMR106 mostraron bandas más intensas que las células MC3T3-E1.

Figura 21. Efecto de TreVO sobre la fosforilación de ERKs en células MC3T3-E1 en función del tiempo.

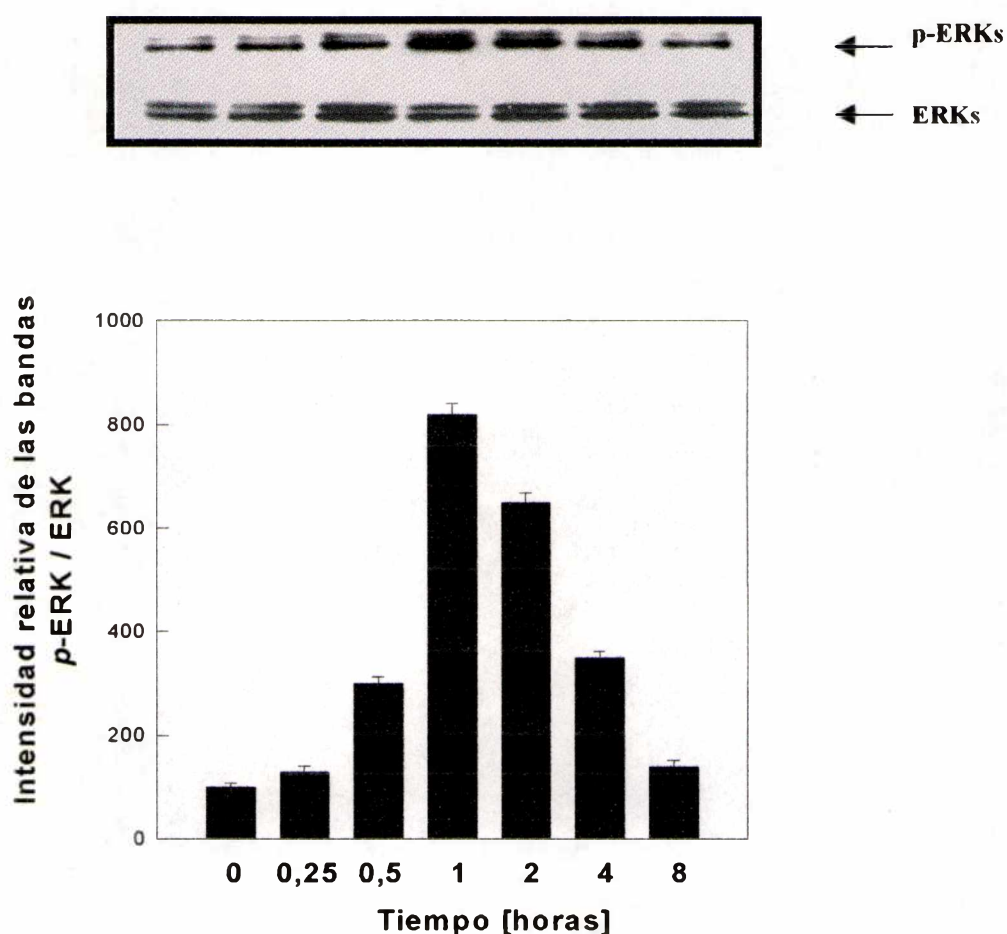


Figura 21. Las Células MC3T3-E1 fueron subcultivadas en platos de 6 pocillos hasta alcanzar el 100 % de confluencia y ayunadas una noche en DMEM sin suero. Luego se incubaron por diferentes períodos de tiempo en DMEM con 0,5 mM de TreVO. Las proteínas se detectaron con anticuerpos para fosfo EKR y ERKs como en el caso de la figura 20. Las áreas relativas porcentuales (p -ERKs / ERKs) de las bandas se muestran en el gráfico de barras. Los valores son: media \pm SEM.

Como puede observarse en el *immunoblot* de la figura 21 la acción sobre la fosforilación de las ERKs fue dependiente del tiempo. La máxima activación de las ERKs se alcanzó a la hora de

incubación para luego declinar lentamente hasta alcanzar otra vez el valor basal a las 8 h aproximadamente.

Figura 22. Efecto de diferentes inhibidores sobre la activación de las ERKs por 1 mM de TreVO.

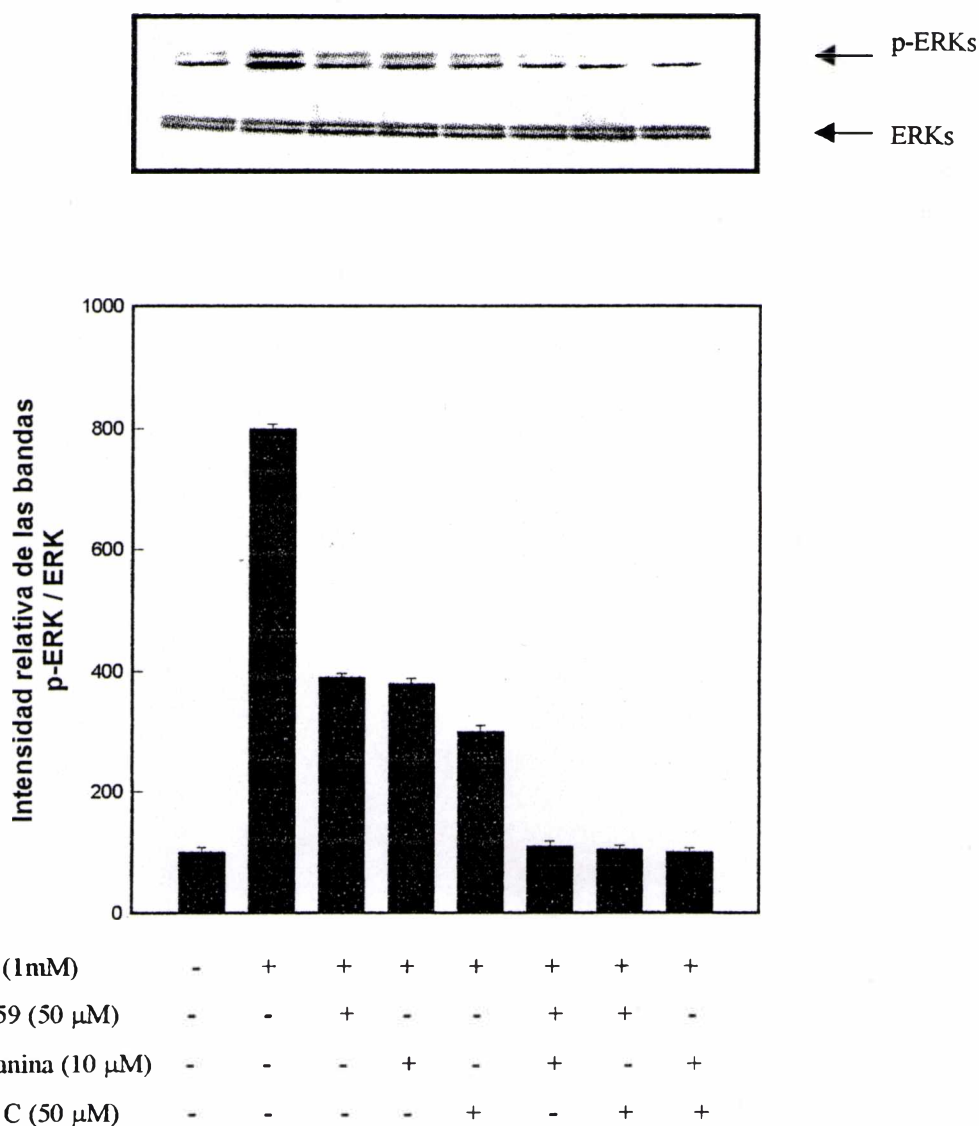


Figura 22. Las células MC3T3-E1 fueron subcultivadas en platos de 6 pocillos hasta alcanzar el 100 % de confluencia y ayunadas una noche en DMEM sin suero. Diferentes pocillos fueron preincubados con inhibidores (6 h con una mezcla de vitaminas E y C (50 μ M), 30 min con 50 μ M PD98059 ó 10 μ M wortmanina), finalmente se adicionó 1 mM de TreVO por una hora. Las proteínas se detectaron con

anticuerpos para fosfo-EKRs y ERKs (dilución 1:1000) y el segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa se diluyó 1:1000. Las áreas relativas porcentuales (*p*-ERKs / ERKs) de las bandas se muestran en el gráfico de barras. Los valores son: media \pm SEM. Se incluyeron diferentes controles con el vehículo y los inhibidores.

Para tratar de entender los mecanismos de acción utilizados por el TreVO para estimular la fosforilación de las ERKs se estudió la participación de la vía de señalización de las MAPKs y la PI3-K. Se utilizaron inhibidores de estas vías tales como PD98059 (inhibidor de MEKs), wortmanina (inhibidor de PI3-K). Además, para analizar el mecanismo inducido por radicales libres, se utilizó una mezcla de vitaminas E y C (*Scavengers* de radicales libres). Los osteoblastos se preincubaron con los inhibidores (6 h para la mezcla de vitaminas y 30 min para los dos restantes) y luego se adicionó TreVO por el término de una hora. La relación *p*-ERKs / ERKs se muestra en el *immunoblot* de la figura 22.

Como puede observarse en la fig. 22 el PD98059, la wortmanina y la mezcla de vitaminas bloquearon parcialmente la fosforilación de las ERKs inducida por el TreVO, mientras que la mezcla de estos inhibidores bloquearon totalmente la activación de las ERKs. Como se observó en la fig 20 las células MC3T3-E1 son más sensibles que las UMR106 a la activación de las ERKs por el TreVO; por ello, las seleccionamos para estudiar qué sucede cuando trabajamos con concentraciones mitogénicas del complejo (25 μ M). Esta dosis también estimuló la fosforilación de las ERKs en forma significativa respecto del basal como lo muestra la figura 23. Es interesante notar que el PD98059 y la wortmanina inhibieron totalmente el efecto estimulante de TreVO en esta línea celular, mientras que la mezcla de vitaminas no tuvo un efecto significativo.

Figura 23. Efecto de diferentes inhibidores sobre la activación de las ERKs por 25 μ M de TreVO.

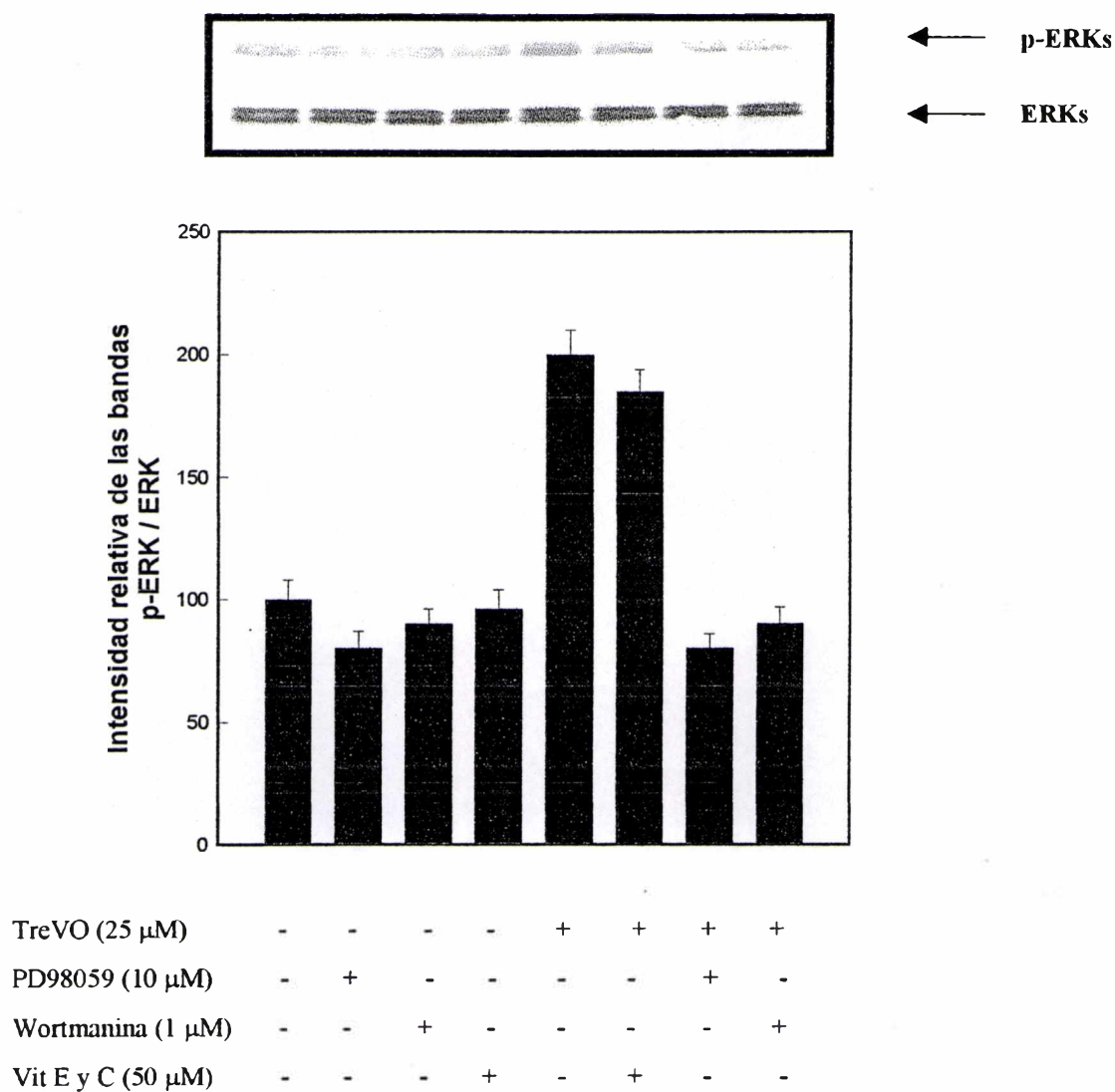


Figura 23. Las células MC3T3-E1 fueron subcultivadas en platos de 6 pocillos hasta alcanzar el 100 % de confluencia y ayunadas una noche en DMEM sin suero. Diferentes pocillos fueron preincubados con inhibidores (6 h con una mezcla de vitaminas E y C (50 μ M), 30 min con 50 μ M PD98059 y 10 μ M wortmanina); finalmente se adicionó 25 μ M de TreVO por una hora. Las proteínas se detectaron con anticuerpos para fosfo-EKRs y ERKs (dilución 1:1000) y el segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa se diluyó 1:1000. Las áreas relativas porcentuales (*p*-ERKs / ERKs) de las bandas se muestran en el

gráfico de barras. Los valores son: media \pm SEM. Se incluyeron diferentes controles con el vehículo y los inhibidores.

Hasta aquí pudimos ver que el TreVO es capaz de inducir la activación de las ERKs con dosis mitogénicas y que el efecto es revertido por el agregado de PD98059 y wortmanina. A continuación, nos preguntamos si los efectos promotores del crecimiento del TreVO pueden ser bloqueados inhibiendo estas vías de señalización. Debido a que el ensayo de proliferación se realiza a 24 h debimos ajustar las concentraciones de los inhibidores para no tener un efecto tóxico a causa de los mismos. Una vez ajustados estos parámetros preincubamos las células MC3T3-E1 con los inhibidores durante los tiempos y las dosis estudiadas (Fig 24).

Figura 24. Efecto de diferentes inhibidores sobre la estimulación de la proliferación de células MC3T3-E1 inducida por TreVO.

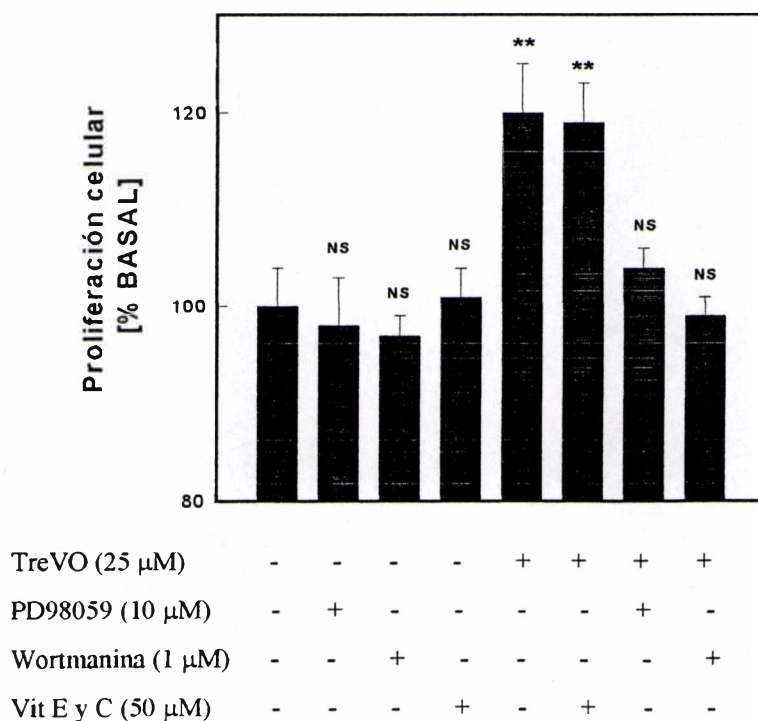


Figura 24. Las células MC3T3-E1 fueron subcultivadas en platos de 24 pocillos hasta alcanzar el 60 % de confluencia y ayunadas una noche en DMEM sin suero. Luego, diferentes pocillos fueron preincubados con inhibidores (6 h con una mezcla de vitaminas E y C (50 μ M), 30 min con 10 μ M PD98059 ó 1 μ M wortmanina) y finalmente se adicionó 25 μ M de TreVO por 24 horas. La proliferación celular se estimó por medio del bioensayo del cristal violeta y los resultados se expresaron como % del basal, media \pm SEM. Las diferencias son respecto del basal (**p < 0,01; NS: no significativo).

En la figura 24 se observa que 25 μ M de TreVO estimula significativamente la proliferación de las células MC3T3-E1 (118 % basal, p < 0,01). Este efecto estimulador fue totalmente bloqueado por el PD98059 o por la wortmanina, pero no por la mezcla de vitaminas E y C. Estos resultados sugieren la participación de las vías de la PI3-K y las ERKs en la acción mitogénica de TreVO.

En otra serie de experimentos tratamos de dilucidar qué tipo de mecanismos podrían estar participando en el aumento del consumo de glucosa inducido por TreVO en las células UMR106. Diferentes investigadores proponen que el vanadio estimularía el consumo de glucosa en células en cultivo a través de la activación de quinasas citosólicas. Para estudiar si en nuestro modelo el consumo de glucosa estimulado por TreVO es mediado por este tipo de quinasas utilizamos la estaurosporina como un inhibidor de las mismas. Dado que la estaurosporina es un inhibidor clásico de PKC, también analizamos qué participación tiene esta quinasa en la estimulación del consumo de glucosa por el TreVO.

Figura 25. Efecto de diferentes concentraciones de estaurosporina sobre el consumo de glucosa estimulado por TreVO (25 μ M) o insulina (5×10^{-8} M).

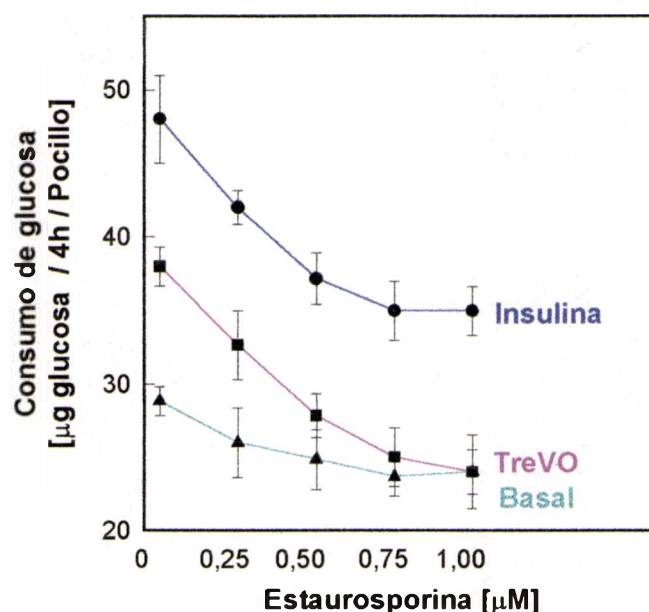


Figura 25. Las células UMR106 fueron subcultivadas en platos de 48 pocillos hasta alcanzar el 100 % de confluencia y ayunadas una noche con DMEM sin suero. Luego, preincubamos las células 30 min con diferentes concentraciones de estaurosporina en DMEM. Finalmente, se agregó 25 μ M de TreVO o insulina (5×10^{-8} M) por el término de 4 h. El consumo de glucosa por los osteoblastos se calculó a partir de la glucosa remanente en el medio de cultivo. El consumo basal de glucosa por los osteoblastos fue de aproximadamente 10 μ g / h / pocillo. Los resultados se expresan en μ g de glucosa consumidos / 4h / pocillo, media \pm SEM.

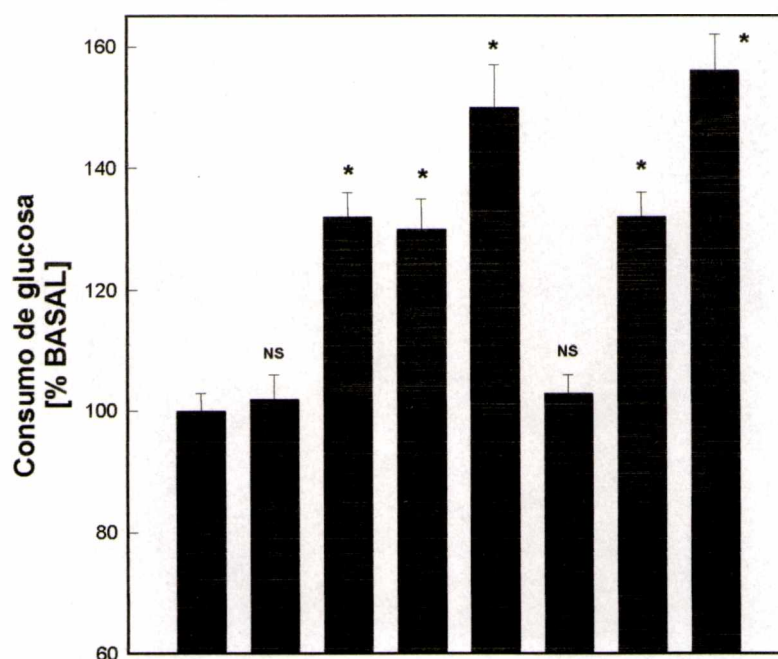
Como puede verse en la figura 25 tanto el complejo TreVO como la insulina estimulan el consumo de glucosa en osteoblastos UMR106. La estaurosporina tuvo un efecto marginal sobre el consumo de glucosa basal (20 % inhibición). La estaurosporina revirtió el efecto estimulante de TreVO en una forma dependiente de la dosis, bloqueándolo totalmente a 1 μ M. La acción de

la insulina también fue afectada por el inhibidor, aunque no fue abolida totalmente como en el caso del complejo de vanadio(IV).

Dado que la estaurosporina también es un inhibidor de la PKC, nos preguntamos si el efecto del vanadio sería mediado por la proteína quinasa dependiente de calcio, además de las quinasas citosólicas propuestas por Shisheva y Shechter. Para responder este interrogante utilizamos un éster de forbol, el 12-miristato-13acetato de forbol y estudiamos la participación de la PKC en la estimulación del consumo de glucosa inducido por TreVO en las células UMR106. Los ésteres de forbol son utilizados por algunos investigadores como activadores de la PKC y como atenuadores de la actividad de la misma, dependiendo de las condiciones de incubación. Cuando se incuban células en cultivo con PMA, en las primeras horas se observa un aumento de la actividad de la PKC, mientras que luego de 16 h decae considerablemente la actividad de esta quinasa. En nuestro modelo de células encontramos que el PMA es un estimulante del consumo de glucosa durante las primeras 10 h de cultivo causando el máximo efecto a $0,1 \mu\text{M}$ (132 % respecto del basal, $p < 0,001$). Por otro lado, encontramos que preincubando las células 16 h con $0,5 \mu\text{M}$ de PMA inhibía posteriormente el consumo de glucosa estimulado por $0,1 \mu\text{M}$ de PMA (efecto producido durante las primeras 10 h de cultivo). En la Figura 26 se muestran estos resultados y los obtenidos con TreVO e insulina.

Como muestran los resultados de la figura 26, la estimulación de $0,1 \mu\text{M}$ de PMA sobre el consumo de glucosa es inhibida por la preincubación de los osteoblastos con $0,5 \mu\text{M}$ de PMA. Es interesante notar que el efecto del complejo de vanadilo(IV) y la insulina no fueron inhibidos por la preincubación con $0,5 \mu\text{M}$ de PMA. Estos resultados sugieren que la PKC, sensible al PMA, no participaría de los efectos metabólicos de TreVO y la insulina.

Figura 26. Efecto del PMA sobre el consumo de glucosa por los osteoblastos UMR106 estimulados con TreVO o insulina.



TreVO (25 μ M)	-	-	+	-	-	-	+	-
Insulina (0,5 10^{-8} M)	-	-	-	-	+	-	-	+
PMA (0,1 μ M)	-	-	-	+	-	+	-	-
PMA (0,5 μ M)	-	+	-	-	-	+	+	+

Figura 26. Células UMR106 subcultivadas en platos de 48 pocillos (100 % confluentes) ayunadas con DMEM una noche y luego preincubadas 16 h con 0,5 μ M de PMA en DMEM de bajo contenido en glucosa (1 g / l), posteriormente se adicionó 25 μ M de TreVO, PMA 0,1 μ M o insulina (5×10^{-8} M) por el término de 4 h. El consumo de glucosa por los osteoblastos se calculó a partir de la glucosa remanente en el medio de cultivo luego de la incubación con TreVO. La glucosa se determinó por el método de la glucosa oxidasa (Kit de Wiener Lab). El consumo basal de glucosa por los osteoblastos fue de aproximadamente 10 μ g / h / pocillo. Los resultados se expresan en μ g de glucosa consumidos / 4h / pocillo, media \pm SEM. Las diferencias son respecto del basal (* $p < 0,001$; NS: no significativo).

Es conveniente ahora preguntarnos qué otras quinasas citosólicas serían las responsables del efecto del TreVO sobre el consumo de glucosa por los osteoblastos. Como se describió anteriormente las vías de las MAPKs y la PI3-K son utilizadas por el complejo de trehalosa para ejercer sus efectos mitogénicos; entonces ¿mediarán estas vías el efecto sobre el consumo de glucosa? Para estudiarlas utilizamos el PD98059 y la wortmanina, ambos inhibidores de las dos vías antes mencionadas.

Figura 27. Efectos de diferentes concentraciones de wortmanina sobre el consumo de glucosa inducido por insulina o TreVO en osteoblastos UMR106.

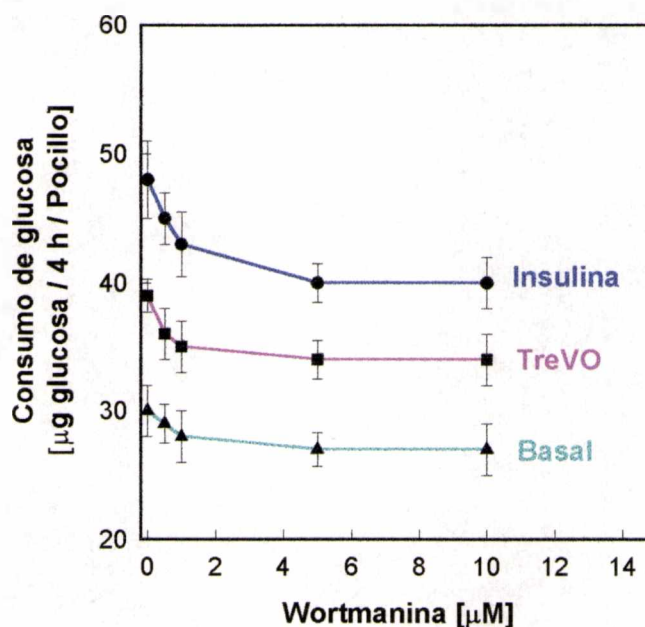


Figura 26. Células UMR106 subcultivadas en platos de 48 pocillos (100 % confluentes) ayunadas con DMEM una noche y luego preincubadas 30 min con diferentes concentraciones de wormanina en DMEM de bajo contenido en glucosa (1 g / l), posteriormente se adicionó 25 µM de TreVO o insulina (5×10^{-8} M) por el término de 4 h. El consumo de glucosa por los osteoblastos se calculó a partir de la glucosa remanente en el medio de cultivo luego de la incubación con el TreVO. La glucosa se determinó por el

método de la glucosa oxidasa (Kit de Wiener Lab). El consumo basal de glucosa por los osteoblastos fue de aproximadamente 10 μg / h / pocillo. Los resultados se expresan en μg de glucosa consumidos / 4h / pocillo, media \pm SEM.

En la figura 27 se muestra el efecto de diferentes dosis de wortmanina sobre el consumo de glucosa estimulado por insulina y TreVO en las células UMR106. El inhibidor de la vía de la PI3-K inhibió parcialmente (15 – 20 % inhibición) el efecto estimulador de la insulina y TreVO. En otra serie de experimentos incluimos el inhibidor de la vía de las MAPKs, pero no revirtió el efecto de la insulina ni del complejo TreVO. Los resultados muestran que en los osteoblastos UMR106 la insulina y TreVO tienen vías alternativas a las MAPKs y la PI3K para estimular el consumo de glucosa.

Discusión

“*Lo* que les voy a decir
Ninguno lo ponga en duda,
Y aunque la cosa es peluda,
Haré la resolución;
Es ladino el corazón
Pero la lengua no ayuda.”

José Hernández. Verso 719

DISCUSIÓN

En este trabajo de tesis se investigó el efecto de diferentes complejos de vanadilo(IV) sobre la actividad de fosfatasa alcalina ósea e intestinal y sobre diferentes parámetros que caracterizan el crecimiento y desarrollo osteoblástico. Además, seleccionamos el complejo de vanadilo con trehalosa para estudiar el efecto crónico sobre los preosteoblastos MC3T3-E1 e investigar las posibles vías involucradas en el mecanismo de acción utilizado por el complejo para ejercer sus acciones biológicas y farmacológicas.

Se obtuvo una familia de complejos de vanadilo(IV) con ligandos glucídicos (mono y disacáridos) y derivados de estos azúcares (alcoholes y ácidos); además incluimos dos alcoholes cíclicos (mioinositol y conduritol C).

Para llevar a cabo los estudios biológicos empleamos dos modelos *in vitro*, uno enzimático y otro celular. Utilizamos fosfatasas alcalinas de origen intestinal y óseo para investigar los efectos inhibitorios de los complejos de vanadio sobre la actividad de fosfatasas y dos líneas de células osteoblásticas: UMR106, derivada de un osteosarcoma de rata y MC3T3-E1, derivada de calvaria de ratón; para estudiar los efectos biológicos y farmacológicos de los compuestos de vanadio.

La razón por la cual estudiamos el efecto biológico de diferentes complejos de vanadio es la relevancia farmacológica que adquirió este metal en la búsqueda de nuevos fármacos para el tratamiento de la Diabetes mellitus. Por otro lado, dado que el vanadio se acumula principalmente en hueso resulta de gran interés su acción sobre el crecimiento y desarrollo osteoblástico.

En sistemas biológicos el vanadio se encuentra mayoritariamente en estado de oxidación (IV y V), pero cuando se administró a animales de experimentación con un objetivo terapéutico, el vanadio(IV) resultó ser menos tóxico que el V(V), por esta razón el vanadio(IV) resulta ser más relevante desde el punto de vista farmacológico. Por otro lado, el vanadio(IV) es insoluble e inestable a la oxidación a pH fisiológico, por ello es necesario el uso de ligandos orgánicos para complejarlo y aumentar su solubilidad y estabilidad frente a la oxidación, mejorando de esta forma su biodisponibilidad. Además, se encontró que algunos complejos del catión vanadilo(IV) son más efectivos que su progenitor y al mismo tiempo son absorbidos más eficientemente en el intestino, un aspecto muy importante si consideramos administrarlo oralmente ya que podríamos

disminuir la dosis diaria administrada y los efectos tóxicos asociados con la misma. Otro aspecto muy importante a tener en cuenta es la excreción del vanadio y, en este sentido, el uso de ligandos orgánicos solubles en medios acuosos aumenta su solubilidad en fluidos corporales promoviendo su excreción urinaria.

Inhibición enzimática.

Como ya hemos mencionado, el vanadio posee diferentes propiedades biológicas y farmacológicas, entre ellas su actividad inhibitoria de fosfatasas fue una de las primeras acciones descritas. Actualmente, los investigadores utilizan diferentes modelos para estudiar y comparar los efectos biológicos del vanadio, entre ellos, los enzimáticos son sistemas simples que nos permiten estudiar las propiedades inhibitorias de los complejos de vanadilo(IV) sobre diferentes fosfatasas alcalinas.

Todos los complejos de vanadio(IV) y el catión vanadilo sin complejar inhibieron la actividad específica de fosfatasa alcalina de origen intestinal. Los complejos con monosacáridos (glucosa y fructosa) poseen una eficacia muy similar entre sí y superior a la del vanadilo, sin embargo, la potencia de GluVO supera a la de FruVO. El vanadilo posee una potencia y eficacia intermedia como inhibidor de la fosfatasa alcalina intestinal comparada con los compuestos estudiados. Los complejos de disacáridos (trehalosa, maltosa, lactosa y sacarosa) son muy diferentes entre sí respecto de su potencia y eficacia para inhibir la FAL intestinal. Los complejos con ácidos (D-sacárico y D-glucónico) se comportaron de forma diferente frente a la inhibición de la FAL intestinal dependiendo del pH de obtención. Los complejos obtenidos a pH =12 fueron levemente más potentes y eficaces que el vanadilo(IV), mientras que los obtenidos a pH ácido inhibieron la enzima con menor potencia y eficacia que el vanadilo. En un trabajo previo utilizando ácido tioglicólico como ligando el complejo de vanadilo(IV) tuvo una potencia similar a la del vanadilo sin complejar (Williams et al 1999). Los complejos con alcoholes lineales (galactitol, sorbitol y manitol) tuvieron potencias y eficacias muy similares al vanadilo; este mismo comportamiento había sido previamente observado con un complejo de vanadilo con tiol (Williams et al 1999). Por otro lado, los alcoholes cíclicos (mioinositol y conduritol C) fueron los complejos que menor potencia y eficacia mostraron respecto de la inhibición de la fosfatasa alcalina intestinal.

Con la idea de comparar el efecto de los complejos de vanadilo(IV) sobre la actividad de distintas fosfatasas, se seleccionaron complejos que fueran representativos de los diferentes grupos de ligandos estudiados. Los complejos elegidos para determinar su potencia y efectividad para inhibir la FAL ósea fueron: FruVO, LacVO, SacVO, TreVO, GolVO, InoVO, ASacVO_{pH: 4}, ASacVO_{pH: 12} y VO²⁺. Los resultados obtenidos muestran que los complejos con alcoholes (InoVO y GolVO) y el vanadilo resultaron ser los inhibidores más potentes y eficaces de todos los complejos ensayados para inhibir la FAL ósea. Los complejos con ácidos (ASacVO_{pH:4} y ASacVO_{pH:12}) fueron muy diferentes entre sí y además invirtieron el orden de potencia y eficacia que habían mostrado para la FAL intestinal. Los complejos con azúcares (SacVO, LacVO, TreVO y FruVO) mostraron una acción inhibitoria sobre la FAL ósea muy similar, mientras que para inhibir la FAL intestinal tuvieron un comportamiento muy diferente entre sí (Tabla I).

Debbie Crans (Crans et al 1989) estudió el efecto del vanadilo y el vanadato sobre la actividad de fosfatasa alcalina intestinal y describió una inhibición enzimática dependiente de las dosis de vanadio, en nuestro laboratorio se obtuvieron resultados similares para un complejo del catión vanadilo con Aspirina sobre fosfatasa de fracciones celulares de osteoblastos (Etcheverry et al 2002b). Peters (Peters et al 2003) investigó el efecto del BMOV sobre la actividad de diferentes PTPasas encontrando un efecto inhibitorio similar al reportado por Crans o por nosotros en este trabajo. La inhibición producida por el complejo BMOV es competitiva y en este caso, la especie involucrada sería el vanadilo “desnudo” y no el complejo. En el modelo utilizado por nosotros, todos los complejos inhibieron la actividad de ambas enzimas en una forma dependiente de la concentración mostrando diferentes potencias. Además, si observamos el orden de eficacia de los complejos para inhibir la FAL ósea vemos que es diferente a la intestinal, sugiriendo que la acción inhibitoria de los compuestos de vanadilo sobre fosfatasas dependería del tipo de ligando y de las características de la enzima. En este caso, ambas fosfatasas comparten un mismo mecanismo de acción, sin embargo el efecto inhibitorio de los compuestos de vanadilo es diferente. Esto podría indicar que las características del sitio activo y el entorno de ambas enzimas (conformación espacial y naturaleza de los aminoácidos) afectarían la acción inhibitoria de los compuestos de vanadio.

El mecanismo de acción de las fosfatasas alcalinas comprende la fosforilación de una serina presente en el sitio activo de la enzima y posteriormente la transferencia del grupo fosfato a una molécula de agua. En el complejo enzima sustrato, el fosfato adopta una geometría de bipirámide

trigonal; esto es también fácilmente adoptado por el anión vanadato, pero no es una estructura usual para el catión vanadilo. Sin embargo, recientemente se demostró que el vanadilo puede adoptar una geometría de coordinación del tipo bipirámide trigonal que se logra en presencia de ligandos flexibles como las proteínas y las enzimas. Esta es una estructura análoga al estado de transición de las fosfatasas (Grant et al 1999). Dado que el estado de transición que involucra al vanadilo sería más estable que el del fosfato, la enzima resulta inhibida. Se propusieron diferentes hipótesis para explicar el efecto de los ligandos sobre el vanadilo para modular su acción inhibitoria sobre las fosfatasas. Una de ellas, propone que la esfera de coordinación producida por los ligandos modificaría la inhibición de la fosfatasas por el vanadilo, sin embargo complejos de vanadio con coordinación seis o siete inhibieron indistintamente la FAL (Crans y Tracey 1998). Si asumimos, de acuerdo con Crans (Crans et al 1989), que la especie inhibitoria es el vanadilo libre, entonces los complejos más estables y menos lábiles inhibirían con menor potencia y efectividad a las fosfatasas. Esta hipótesis no explica porqué hay complejos de vanadilo que son más efectivos y potentes que el vanadilo o el vanadato. También se puede pensar que la oxidación del vanadilo a vanadato podría estar jugando un papel importante en este efecto y que los ligandos protegerían al vanadilo de la oxidación, sin embargo, el vanadato es un inhibidor menos potente que el vanadilo para las fosfatasas que utilizamos en nuestros ensayos, por lo que tampoco permite explicar nuestros resultados.

Así, éstos indican que los ligandos estarían jugando un papel preponderante en la inhibición de las fosfatasas alcalinas. Una posibilidad es que los ligandos actúen activando o desactivando electrónicamente al vanadilo para ser atacado por la enzima, además del papel que podrían jugar los factores estéricos de los mismos.

Proliferación

El crecimiento y la proliferación de las células UMR106 y MC3T3-E1 son estimulados por diferentes factores de crecimiento a través de su unión a receptores de membrana del tipo tirosina quinasa. Se describió que los compuestos de vanadio producen efectos característicos de los factores de crecimiento tales como estimular la síntesis de ADN, promover el ciclo celular y la

expresión de genes relacionados con la proliferación y el crecimiento (Smith 1983; Wice et al 1987).

Los complejos de vanadio actuarían como factores de crecimiento sobre diferentes líneas de osteoblastos en cultivo (Cortizo y Etcheverry, 1995; Etcheverry y Cortizo, 1998). La insulina estimula la proliferación de las células UMR106 y MC3T3-E1 al igual que los complejos de vanadio(IV), sin embargo la eficacia de estos últimos es menor y depende significativamente del tipo de ligando. Los compuestos con acción mitogénica tuvieron un comportamiento bifásico, a bajas dosis (aproximadamente 10 μ M) estimularon la proliferación y a altas (100 μ M) la inhibieron. Estos resultados concuerdan con los de otros investigadores que utilizaron líneas celulares diferentes, por ejemplo cultivos de células epiteliales y de calvaria de rata o intestinales (Jones y Reid 1984; Canalis 1985; Raid et al 1993). Este comportamiento bifásico es característico de los elementos esenciales; así, en los diagramas de Bertrand se puede observar este tipo de curvas (Baran 1995). La esencialidad del vanadio solo fue demostrada en plantas y animales, pero no está aún fehacientemente determinada en el hombre (Nielsen 1990).

En particular, las células UMR106 mostraron una respuesta mitogénica mayor a los complejos de vanadio(IV) que las células MC3T3-E1. Los complejos de glucosa, sacarosa y el de ácido sacárico obtenido a pH = 4, fueron los únicos que no estimularon la proliferación de los osteoblastos UMR106. Por otro lado, las células MC3T3-E1 fueron estimuladas a proliferar por los complejos de glucosa, fructosa, maltosa, trehalosa, galactitol y ácido glucónico. Estos resultados sugieren que habría dos factores importantes a tener en cuenta en la estimulación de la proliferación de los osteoblastos por los complejos de vanadio(IV): primero, el tipo celular ya que un mismo compuesto produce efectos diferentes sobre ambas líneas celulares y segundo, el tipo de complejo o especie de vanadio(IV) ya que sobre la misma línea celular encontramos diferentes respuestas mitogénicas frente a diversos complejos de vanadio(IV).

El mecanismo molecular y bioquímico exacto por el cual los compuestos de vanadio median sus efectos mitogénicos no está claramente dilucidado aún. Actualmente, se considera que el vanadio no estimula por sí mismo la fosforilación en tirosina o la actividad quinasa del receptor de insulina, sino que incrementaría la fosforilación de proteínas intracelulares como las MAPKs, las cuales tienen un papel preponderante en la transducción de señales de la insulina y otros factores de crecimiento. El mecanismo por el cual el vanadio promueve la fosforilación de proteínas en

restos de tirosina sería a través de la inhibición de PTPasas, dado que el vanadio es un inhibidor específico de éstas (Shechter et al 1998).

Estudios realizados con vanadato en células murinas 3T3T (CSV3) normales y transformadas con el virus SV40 mostraron un comportamiento diferente. En las células normales el vanadio no promovió la proliferación celular, mientras que en las transformadas sí lo hizo. La hipótesis de los investigadores es que la transformación de las células CSV3 con el virus SV40 modificó proteínas reguladoras como tirosina fosfatasas o tirosina quinasas, mediando el vanadato sus efectos a través de éstas (Wang y Scott 1995). Hay diferentes PTPasas involucradas en las señales intracelulares de la insulina y en la regulación de la proliferación celular que son candidatas a la inhibición por los compuestos de vanadio(IV). Entre otras, cabe citar a la PTP-1B, LAR, SHP-2 y MKPs (Milarski y Saltiel 1994; Xiao et al 1994; Zang 1998; Keyse 2000; Cheng et al 2002).

Los osteoblastos UMR106 presentan características tumorales y los preosteoblastos MC3T3-E1 que son fenotípicamente normales, tienen la capacidad de diferenciarse. Por lo tanto, las modificaciones genéticas que sufrieron ambas líneas celulares cuando se clonaron fueron distintas, pudiendo suponer que el tipo de proteínas reguladoras como por ejemplo fosfatasas y quinasas serían diferentes, con lo cual podríamos esperar que la respuesta de las células a los complejos de vanadio fuera diferente.

El segundo punto a tener en cuenta es el tipo de complejo de vanadio(IV) involucrado en la acción mitogénica. Si se considera que el efecto de los compuestos de vanadio es ejercido a través de la inhibición de PTPasas, podríamos explicar el efecto de los complejos de vanadilo(IV) atribuyéndolo a una inhibición selectiva de las diferentes PTPasas que regulan las señales mitogénicas de los osteoblastos. Por otro lado, observamos que la efectividad de los diferentes complejos para estimular la proliferación de los osteoblastos UMR106 (Tabla II) no correlaciona con la potencia y efectividad inhibitoria de FAL ósea (Tabla I).

La posibilidad de que complejos metálicos posean propiedades antitumorales ha sido considerada desde hace mucho tiempo, sin embargo, esta alternativa cobró interés con el descubrimiento del Cisplatino, *cis*-PtCl₂(NH₃)₂ (Rosenberg et al 1969) Posteriormente, se describieron complejos de vanadio con estas propiedades siendo los más estudiados el bisciclopentadienildicloro-V(IV), (C₅H₅)₂VCl₂ y los peroxoderivados (Djordjevic 1995).

En el presente trabajo observamos que las células UMR106 fueron más sensibles que las MC3T3-E1 a la inhibición de la proliferación por los complejos de glucosa y trehalosa en concentraciones superiores a 50 μ M. Otros derivados del catión vanadilo(IV) con antiinflamatorios no esteroideos como la Aspirina y el Naproxeno produjeron efectos similares (Etcverry et al 2000; Etcverry et al 2002a,b). Estos resultados son alentadores si se piensa en un potencial uso de estos compuestos como agentes antitumorales. Existen actualmente diferentes grupos de trabajo dedicados a la búsqueda de nuevos complejos de vanadio con propiedades antitumorales (Hanauske et al 1987; Djordjevic 1995; Evangelou 2002).

El mecanismo por el cual el vanadio media los efectos antiproliferativos aún no se conoce en detalle. Hay diferentes propuestas que tratan de explicar los resultados obtenidos; pero, se debe tener en cuenta que los efectos del vanadio son dependientes de la dosis y que altas concentraciones producen efectos citotóxicos indeseables en células en cultivo. Por esta razón, es necesario diferenciar los efectos citotóxicos de las propiedades antitumorales de los compuestos de vanadio.

Cruz y colaboradores estudiaron el efecto del vanadato sobre la proliferación de células tumorales para evaluar su potencial aplicación en el tratamiento del cáncer (Cruz et al 1995). Ellos encontraron que las células en estado de proliferación activa eran inhibidas en mayor proporción que las células que no habían sido inducidas a proliferar con FBS. Estos autores proponen un mecanismo oxidativo a través de radicales libres y peróxido de hidrógeno que inducen efectos citotóxicos en células tumorales, para explicar los efectos antitumorales del vanadio. Diferentes investigadores sugieren que el estrés oxidativo y la inducción de apoptosis pueden ser los mecanismos responsables del efecto inhibitorio de los compuestos de vanadio sobre la proliferación celular (Zhang et al 2001; D'Cruz y Uckun 2002; Cortizo et al 2001).

Estudios realizados en nuestro laboratorio muestran que el complejo de vanadilo con glucosa induce la apoptosis en las células UMR106 en mayor medida que las MC3T3-E1, sugiriendo que éste sería un mecanismo por el cual algunos complejos de vanadio ejercen su actividad antitumoral. La preincubación de las células UMR106 con vitaminas E y C bloquean totalmente la inducción de apoptosis por el GluVO, sin embargo, las vitaminas no revierten en igual medida el efecto antiproliferativo (Molinuevo et al 2004). Estos resultados sugieren que la inducción de

apoptosis no sería el único mecanismo por el cual los complejos de vanadio, como el GluVO, ejercerían su acción antitumoral.

Por otro lado, se encontró que el vanadato inhibe la proliferación de fibroblastos en cultivo y al analizar el ciclo celular de estas células por citometría de flujo, se observó una cantidad significativa de células en la transición G2-M, sugiriendo que el vanadato estaría bloqueando esta etapa del ciclo celular. Dado que la PTPasa cdc25 participa en la regulación de esa etapa del ciclo celular, se sugiere que el efecto inhibitorio del vanadato sobre la proliferación de los fibroblastos sería mediado por la inhibición de estas fosfatasa (Baratte et al 1992; Zhang et al 2002).

Otro mecanismo propuesto para explicar el efecto antitumoral de algunos complejos de vanadio, como los vanadocenos, es su interacción con los grupos fosfato del ADN bloqueando la transcripción del mismo; la especie $(C_5H_5)_2V^{2+}$ sería la responsable de esta interacción (Toney et al 1985; Djordjevic 1995). No obstante, este mecanismo no parecería explicar los resultados obtenidos con los complejos estudiados por nosotros ya que los complejos de trehalosa o glucosa son sales de sodio que al disolverse en medio acuoso generan probablemente compuestos aniónicos y el catión Na^+ .

Por lo tanto, el efecto inhibitorio sobre la proliferación de las células UMR106 de los complejos GluVO y TreVO podría estar mediado en parte por la generación de radicales libres y la inducción de apoptosis (Molinuevo et al 2004; Molinuevo et al, manuscrito en preparación) y por otra parte a través de la inhibición selectiva de algunas fosfatasa que regulan el ciclo celular como la PTPasa cdc25.

Finalmente, el efecto del vanadio sobre la proliferación dependerá del papel de las PTPasa específicas que participan en la regulación de la proliferación de las células MC3T3-E1 o de las células tumorales UMR106. Mutaciones particulares que afecten la expresión de genes que codifican distintas PTPasa podrían hacer las células más o menos sensibles a la acción del vanadio. Además, todos estos efectos sobre el crecimiento y la proliferación dependen de las concentraciones y especies de vanadio presentes en el medio de cultivo, mostrando en la mayoría de los casos un efecto bifásico.

Diferenciación celular

La diferenciación celular es un proceso que permite a las células precursoras especializarse en una función particular. Los preosteoblastos se diferencian a osteoblastos mediante una serie de eventos regulados a través de la expresión de diferentes genes promovidos por factores de crecimiento y otros agentes inductores. En el proceso de diferenciación osteoblástica se expresan proteínas características como colágeno de tipo I, fosfatasa alcalina, osteocalcina y osteopontina. Las células UMR106 son un modelo de osteoblastos diferenciado que expresa, entre otras proteínas; colágeno de tipo I y fosfatasa alcalina, siendo ambos utilizados como marcadoras del fenotipo osteoblástico. Las células MC3T3-E1 son preosteoblastos que en presencia de AA y β -GP se diferencian a osteoblastos en un proceso que dura aproximadamente un mes. Dado que las células UMR106 tienen características de osteoblasto diferenciado y no es necesario cultivarlas por largos períodos en condiciones especiales, es más simple estudiar los efectos de todos los complejos de vanadilo(IV) sobre la diferenciación osteoblástica en esta línea celular. Más adelante se discutirá el efecto de TreVO sobre las diferentes etapas del desarrollo osteoblástico en el modelo de células MC3T3-E1.

Estudios realizados con vanadio muestran cierta controversia con relación a la diferenciación celular ya que se han descripto efectos contrapuestos. Las acciones del vanadio sobre la diferenciación celular parecen ser mediadas por la inhibición de fosfatasas (Wei y Yung 1995; Liao y Lane 1995).

Para estudiar el efecto de los complejos de vanadio sobre la diferenciación de las células UMR106, se evaluaron dos marcadores óseos: la actividad específica de FAL y la producción de colágeno.

Todos los complejos estudiados inhibieron la actividad de FAL en una forma dependiente de la dosis, sin embargo lo hicieron con diferente potencia y eficacia. Los complejos con trehalosa, maltosa, fructosa y ácido sacárico inhibieron aproximadamente entre un 20 y un 34 % la actividad de FAL, mientras que los complejos con alcoholes inhibieron entre un 60 y un 80 % la actividad de la enzima. El resto de los complejos tuvo un efecto inhibitorio intermedio respecto de los antes mencionados, incluyendo el vanadilo(IV) que inhibió un 46 %. Resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio con otros derivados de vanadio (IV) y (V) fueron similares,

dependiendo siempre de la concentración y la especie de vanadio ensayada (Cortizo y Etcheverry, 1995; Etcheverry et al 1997). Si se comparan los resultados de inhibición de la FAL en las células (Tabla III) con los obtenidos en ensayos de inhibición de FAL ósea *in situ* (Tabla I) se puede observar que, en general, se conserva el orden de eficacia de los complejos de vanadio, no así para la FAL de origen intestinal. Los complejos con alcoholes fueron los más eficaces, en tanto que los derivados de trehalosa, fructosa o ácido sacárico fueron los menos eficaces para inhibir la FAL de origen óseo. Estos resultados sugieren que el efecto inhibitorio de los complejos de vanadio sobre la diferenciación, evaluada a través de la FAL, podría deberse a una acción directa sobre la actividad de la FAL de los osteoblastos UMR106 más que a un efecto sobre la expresión génica o la síntesis de la proteína.

Por otro lado, la producción de colágeno fue estimulada con la misma potencia por el vanadilo y los complejos con trehalosa y sacarosa; sin embargo, la eficacia de estos complejos sobre éste parámetro fue diferente para cada uno de ellos. TreVO fue el más eficaz (140 % basal) para promover la producción de colágeno, SacVO tuvo una eficacia intermedia (130 % basal) y el vanadilo(IV) fue el menos potente y eficaz de los tres (110 % basal). Estudios realizados en otros modelos de células osteoblásticas en cultivo mostraron que el vanadio también estimuló la producción de colágeno (Canalis 1985; Lau et al 1988).

Estos resultados sugieren que el vanadio y sus complejos promueven la diferenciación osteoblástica al inducir la producción de colágeno ya que esta proteína es esencial para la diferenciación de células óseas. Además, la complejación del catión vanadilo con ligandos orgánicos favoreció la inducción de la diferenciación osteoblástica a través de mecanismos no determinados en esta tesis. Aunque el efecto de los diferentes complejos de vanadilo(IV) sobre la FAL fue inhibitorio, es importante resaltar que esta línea UMR106 no mineraliza en cultivo ni expresa marcadores tardíos de maduración osteoblástica. Por esos motivos, los efectos del complejo TreVO sobre las diferentes etapas del desarrollo osteoblástico fueron estudiados en un modelo más “fisiológico” como lo es el de las células MC3T3-E1 cultivadas a largo plazo.

Consumo de glucosa.

El consumo de glucosa por los osteoblastos es estimulado por diferentes factores de crecimiento, fundamentalmente por la insulina y el IGF-I ejerciendo ambos una acción fisiológica muy importante sobre el hueso. En células osteoblásticas en cultivo la insulina promueve diferentes efectos metabólicos como la síntesis de proteínas y el transporte de glucosa. El vanadato es capaz de mimetizar algunos de los efectos de la insulina en células osteoblásticas en cultivo (Canalis 1995; Lau et al 1988; Cortizo y Etcheverry 1995; Etcheverry et al 1997). Dado que las células MC3T3-E1 necesitan aproximadamente 16 días de cultivo en presencia de AA y β -GP para que el consumo de glucosa pueda ser determinado con nuestra metodología, solo utilizamos las células UMR106 para este tipo de estudios. Estas células poseen receptores para la insulina y responden a ésta incrementando la captación de glucosa, probablemente a través de los transportadores de glucosa 1 y 3 (Ituarte et al 1989, Thomas et al 1996).

En general los complejos de vanadio(IV) estimularon el consumo de glucosa por los osteoblastos UMR106, sin embargo no fueron tan eficaces como la insulina. Los complejos con azúcares, mono y disacáridos, fueron los más eficaces para estimular el consumo de glucosa por los osteoblastos. Con excepción de los complejos con sorbitol y manitol, los complejos de vanadio(IV) con alcoholes y ácidos también estimularon el consumo de glucosa aunque no fueron tan eficaces como los derivados de mono y disacáridos. El vanadilo(IV) en particular tuvo un efecto estimulante intermedio (123 % basal) comparado con el complejo de trehalosa que estimuló un 132 % del basal, siendo el más eficaz de todos. Estos resultados son similares a los encontrados por otros investigadores en diferentes líneas celulares utilizando distintos compuestos de vanadio (Tolman et al 1979; Dubyak y Kleinzeller 1980; Tamura et al 1983; Ninfali et al 1983; Bernier et al 1988). En general se observa que la complejación del vanadio(IV) con ligandos orgánicos modula las acciones insulinomiméticas del vanadio, ya sea potenciándolas o disminuyéndolas.

Al correlacionar los efectos sobre el consumo de glucosa por los osteoblastos con la inhibición de las fosfatasa o el efecto sobre la proliferación celular, no se encontró una correspondencia entre uno y otro efecto. Así, los resultados sugieren que cada una de las acciones insulinomiméticas del

vanadio es consecuencia de la estimulación de vías diferentes, que operan en forma simultánea y que probablemente tengan lugar a través de la inhibición de distintas fosfatasas.

Si se analizan los resultados obtenidos hasta aquí, se observa que hay complejos de vanadio(IV) que poseen una mayor acción biológica sobre los parámetros estudiados e inducen menores efectos tóxicos en concentraciones de 100 μ M. En general, algunos de los complejos con azúcares resultaron ser los más interesantes desde el punto de vista insulinomimético, entre ellos se debe mencionar a TreVO, MalVO, FruVO y LacVO. El complejo con trehalosa fue el compuesto más eficaz para estimular el consumo de glucosa y además, en forma similar al GluVO mostró un efecto diferente sobre la proliferación de ambas líneas celulares, comportándose como un agente antitumoral. Por estas razones, se seleccionó el complejo de vanadilo(IV) con trehalosa para realizar estudios más específicos de su actividad biológica y sus efectos tóxicos en osteoblastos en cultivo.

Alteraciones morfológicas

Superada la concentración óptima, el vanadio, al igual que otros elementos de transición, produce efectos citotóxicos. En nuestro modelo se evaluaron los efectos tóxicos a través de las alteraciones morfológicas, como por ejemplo alteraciones en las proteínas del citoesqueleto como la actina. En esta serie de estudios se utilizaron diferentes técnicas y tinciones para poner de manifiesto algunas de las alteraciones causadas por el complejo de trehalosa sobre los osteoblastos en cultivo.

Al observar las fotos de las dos líneas celulares teñidas con Giemsa (Fig. 8 y 11) se puede ver que ambas son muy diferentes. Las células MC3T3-E1 tienen núcleos uniformes y del mismo tamaño con una relación núcleo / citoplasma característico de una célula normal. Por otro lado, las células UMR106 presentan núcleos irregulares, muchos de ellos de forma arrionada, la relación núcleo / citoplasma es mayor, siendo esto característico de células tumorales. Ambas líneas celulares fueron incubadas con 10 μ M de TreVO y no sufrieron cambios morfológicos que muestren algún efecto tóxico. Las células UMR106 tratadas con 100 μ M de TreVO muestran cambios morfológicos muy importantes, tales como menor número de conexiones intercelulares, el citoplasma está condensado y los núcleos son más oscuros. Las células MC3T3-E1 fueron menos

afectadas que las tumorales por 100 μ M de TreVO, sin embargo, en los osteoblastos no transformados esta dosis del complejo también causó cambios morfológicos importantes: los núcleos se tiñeron más oscuros con Giemsa y las células perdieron gran parte de las conexiones intercelulares. Estas observaciones sobre los efectos deletéreos de altas concentraciones del complejo estuvieron en concordancia con la mayor inhibición del crecimiento del osteosarcoma UMR106 en comparación con los osteoblastos normales MC3T3-E1 (Tabla II).

Las alteraciones del citoesqueleto son un buen parámetro para estudiar la toxicidad de diferentes drogas. El citoesqueleto es una estructura de filamentos de actina que contribuye a la integridad de la célula, define la forma celular y posee gran importancia en todos los procesos de adhesión celular. Las células MC3T3-E1 fueron incubadas con TreVO y luego con FITC-Paloidina para poder observar por microscopía de fluorescencia los cambios en la distribución de actina, además se incluyeron controles sin el complejo. Las fotos de fluorescencia muestran las fibras de actina de las células MC3T3-E1 distribuidas uniformemente (Fig. 14) las cuales no fueron modificadas o afectadas por 10 μ M de TreVO. Sin embargo, altas dosis del complejo (100 μ M) produjeron cambios importantes en la distribución de las fibras de estrés. Estos resultados concuerdan con los cambios morfológicos previamente descriptos.

Efectos de TreVO sobre el desarrollo osteoblástico de las células MC3T3-E1

In vivo, la formación del hueso atraviesa por diferentes estadios de desarrollo que incluyen la proliferación de células precursoras de osteoblastos, expresión del fenotipo osteoblástico y por último la mineralización de la matriz extracelular. La línea de células MC3T3-E1, derivadas de calvaria de ratón, tiene la capacidad de diferenciarse a lo largo del tiempo de cultivo en osteoblastos maduros, atravesando los diferentes estadios de maduración de un preosteoblasto normal (Sudo 1983; Quarles et al 1992).

La importancia del vanadio en el hueso surge de estudios realizados para tratar de establecer la esencialidad de este elemento y de su relación con el metabolismo de la tiroides y la formación del esqueleto (Uthus y Nielsen 1990; Nielsen 1995). Anke y colaboradores encontraron alteraciones óseas en cabras que habían sido alimentadas con dietas deficientes en vanadio (Anke

et al 1990) Por otro lado, estudios sobre la absorción, el metabolismo y la excreción de vanadio mostraron una acumulación preferencial en hueso, riñón e hígado (Setyawati et al 1998).

Como se mencionó anteriormente, se seleccionó el complejo de vanadilo con trehalosa para realizar ensayos más específicos ya que es un buen candidato para continuar estudiando su acción insulinoimimética. Para investigar el efecto de TreVO sobre el crecimiento y la diferenciación de las células MC3T3-E1 a lo largo de los días de cultivo, se incubaron las células en presencia de DMEM + FBS (basal), DMEM + FBS + TreVO, y se incluyó un control con DMEM + FBS + AA y β -GP. Las células MC3T3-E1 proliferaron normalmente hasta aproximadamente el día 9 de cultivo tanto en presencia del complejo de vanadilo(IV) con trehalosa como de AA y β -GP, observándose solo un leve, pero significativo aumento en el número de células para la condición control (Fig. 15). Entre los días 10 y 25 de cultivo, el número de células se mantuvo aproximadamente constante para las tres condiciones de cultivo. Este comportamiento en la proliferación es el esperado para esta línea celular ya que cuando alcanzan la confluencia sufren un arresto en la proliferación para iniciar su etapa de diferenciación (Quarles et al 1992). Experimentos de proliferación realizados sin FBS durante 24 h mostraron que el complejo TreVO estimula la proliferación de estas células (Fig. 4). Estos resultados junto con los encontrados a largo término sugieren que TreVO es un promotor de la proliferación de estas células en la etapa proliferativa.

La expresión de la fosfatasa alcalina y la síntesis de colágeno son las primeras evidencias de que el preosteoblasto inició el proceso de diferenciación a un osteoblasto más maduro. A los 10 días de cultivo comenzó a detectarse la presencia de colágeno (Fig. 16 b), sin embargo no se observaron diferencias significativas para las distintas condiciones. El aumento más importante en el contenido de colágeno de las células MC3T3-E1 se observó entre los días 10 y 16 de cultivo. La mezcla de AA + β -GP y el complejo TreVO promovieron fuertemente el aumento del contenido de colágeno, siendo la mezcla más eficaz que el complejo. Entre los días 16 y 25, el contenido de colágeno continuó aumentando aunque en menor proporción, manteniéndose la misma tendencia para las tres condiciones experimentales. La fosfatasa alcalina es otro parámetro que caracteriza la maduración osteoblástica de las células MC3T3-E1. Durante los primeros días de cultivo la actividad de la FAL fue indetectable en esta línea celular (Fig. 16 c), sin embargo a los 10 días comenzaron a observarse algunos indicios de actividad enzimática. Entre los 10 y 16

días de cultivo la actividad de FAL se incrementó significativamente para las tres condiciones, pero el aumento fue muy diferente para cada una de ellas. La mezcla de AA y β -GP indujo la actividad de FAL en un 400 % respecto del basal para el mismo período de tiempo. Por otro lado, las células incubadas en presencia de TreVO aumentaron la actividad de FAL entre los 10 y 16 días de incubación, aunque este incremento fue solo un 50 % del alcanzado en condiciones basales. Probablemente, lo que esté ocurriendo es que la acción promotora de la diferenciación medida a través de la actividad específica de fosfatasa alcalina resulta inhibida por el complejo TreVO. Entre los 16 y 25 días de cultivo, la actividad basal de FAL aumentó un 20 %, mientras que las células incubadas en presencia de TreVO no mostraron ningún cambio en la actividad de FAL. La mezcla de AA y β -GP continuó promoviendo la actividad de FAL para el período comprendido entre los 16 y 25 días. Estos datos sugieren que el complejo TreVO podría afectar la mineralización de la matriz extracelular al comprometer la actividad de FAL. Para tratar de evaluar esta hipótesis, los osteoblastos MC3T3-E1 se cultivaron por 30 días con AA y β -GP en ausencia o presencia de TreVO y se analizó la formación de nódulos de mineralización. Contrariamente a lo esperado, TreVO promovió la formación de nódulos de mineralización como puede observarse en las fotos de la figura 18. Estos resultados sugieren que el complejo TreVO tiene un efecto positivo sobre la diferenciación y la mineralización de las células MC3T3-E1, comportándose como un agente osteogénico.

En relación con los eventos metabólicos cabe decir que el consumo basal de glucosa por los preosteoblastos MC3T3-E1 es muy pequeño comparado con el de los osteoblastos UMR106, sin embargo a medida que transcurren los días de cultivo el consumo de glucosa aumenta significativamente (Fig. 17). Entre los 10 y 16 días de cultivo se observó un incremento significativo del consumo de glucosa basal por los osteoblastos MC3T3-E1. Tanto TreVO como la mezcla de AA y β -GP promovieron el consumo de glucosa en mayor medida que el basal, siendo la mezcla más efectiva que el complejo. Entre los 16 y 25 días de cultivo el consumo de glucosa se mantuvo aproximadamente constante respecto del período anterior, observándose el mismo comportamiento para las tres condiciones. Los datos muestran que en la etapa inicial de la diferenciación de las células MC3T3-E1 se producen cambios importantes a nivel del metabolismo de la glucosa. Uno de estos cambios podría ser la expresión de transportadores de glucosa que faciliten el ingreso de la glucosa a las células. Además, ocurren cambios celulares

muy importantes que requieren de energía, como la síntesis de nuevas proteínas. Todos estos cambios serían favorecidos por el complejo TreVO y la mezcla de AA y β -GP.

Mecanismo de acción del TreVO.

El mecanismo por el cual el vanadio ejerce sus acciones insulinomiméticas es actualmente de gran interés para muchos investigadores. La inhibición de diversas fosfatasas parece ser uno de los mecanismos más aceptados por lo que dependería del compuesto de vanadio y de la enzima en cuestión (Salice et al 1999; Shechter et al 1995). Respecto de los efectos insulinomiméticos, además de las PTPasas relacionadas con las señales de la insulina, fueron sugeridas otras fosfatasas que están involucradas en el metabolismo de la glucosa como la glucosa-6-fosfatasa y la fructosa-2,6-bifosfatasa, como posibles vías utilizadas por los compuestos de vanadio para ejercer estos efectos (Pandey et al 1998; Sekar et al 1999). La inhibición de PTPasas genera un desequilibrio en la fosforilación de proteínas en restos de tirosina aumentando así la proporción de proteínas fosforiladas en residuos de Tyr, mientras que la inhibición de las fosfatasas de la glicólisis favorece el metabolismo de la glucosa.

Para tratar de entender los mecanismos de acción utilizados por el vanadio y las vías que son activadas por él, se estudió la fosforilación de proteínas en restos de tirosina inducida por TreVO. El *immunoblot* reveló diferentes bandas de proteínas fosforiladas en restos de tirosina en respuesta a TreVO, en una forma dependiente de la dosis. Resultados similares fueron encontrados por otros investigadores que utilizaron otros complejos de vanadio y diferentes líneas celulares (Crans 1998; Nxumalo et al 1998). Estas diferencias observadas en los *immunoblots* pueden atribuirse a la inhibición de distintas PTPasas, además de las características particulares de cada línea celular.

En nuestro sistema aparece una banda muy intensa alrededor de los 40 kDa que incrementa su intensidad con la concentración de TreVO. Esta banda podría atribuirse a las MAPKs; por ello, se analizó en particular la fosforilación de las ERKs, encontrando que el complejo TreVO inducía un aumento en la fosforilación de las ERKs en una forma dependiente de la dosis. Las bandas correspondientes a las ERKs de las células UMR106 sin tratar fueron más intensas que las observadas para las MC3T3-E1, probablemente por el carácter tumoral de las primeras. La

activación de las ERKs por el TreVO fue dependiente del tiempo, mostrando un comportamiento tipo campana con un máximo alrededor de la hora, para luego declinar más lentamente hasta alcanzar el valor basal a las 8 horas. Este efecto es característico de agentes mitogénicos; sustancias que activan de forma transitoria a las ERKs promueven la proliferación celular, mientras que la activación permanente induce transformaciones celulares importantes (Cowley et al 1994).

Las ERK_{1/2} son proteínas de 42 y 44 kDa que se expresan ubicuamente en los tejidos. El grado de activación de las ERKs depende del agente inductor, del tejido y del contexto celular (Lewis et al 1998). La cascada de transducción de señales de las ERKs es activada por diferentes receptores de membrana. La vía de las ERKs se inicia por las proteínas adaptadoras Grb2 y Shc que interaccionan con los residuos de fosfotirosina del receptor de factores de crecimiento, de la insulina y de otras proteínas como los IRSs. La finalización de las señales de la vía de las ERKs es un proceso mediado por PTPasas. Las fosfatasa de las MAPKs, MKPs, desactivan señales mitogénicas por desfosforilación de las ERKs (Sun et al 1993; Keyse 1995; Chu et al 1996; Keyse 2000). Se han descrito diferentes fosfatasa que desfosforilan y desactivan las ERKs, entre ellas podemos citar a la fosfatasa nuclear MKP-1 la cual desfosforila las *p*-ERKs en el núcleo (Sun et al 1993; Groom et al 1996), la PP-2A que tendría un papel preponderante en la finalización de la fase temprana de una respuesta mediada por las ERKs (Alessi et al 1995). La inactivación de las MAPKs puede ocurrir también a través de múltiples fosfatasa inespecíficas (Keyse 1995).

La mayoría de los investigadores concuerdan en que la activación de las ERKs por el vanadio tiene lugar a través de la inhibición de fosfatasa las cuales pueden estar ubicadas en etapas previas a la fosforilación de las ERKs, activando la vía ras / ERKs o ser fosfatasa que actúan directamente sobre las *p*-ERKs. Se proponen dos mecanismos fundamentales para la inhibición de las PTPasas por los compuestos de vanadio, uno es a través de la generación de radicales libres y el otro a través de la inhibición directa de la actividad enzimática de las PTPasas por el vanadio ((Posner et al 1998). Para tratar de establecer cual sería el mecanismo y la vía de transducción de señales utilizadas por TreVO para inducir la fosforilación de las ERKs se utilizaron diferentes inhibidores y una mezcla de vitaminas E y C como *scavengers* de radicales libres. Tanto el PD98059, inhibidor de MEK, como la wortmanina, inhibidor de la PI3-K y la mezcla de vitaminas bloquearon parcialmente la activación de las ERKs por 1 mM de TreVO. La

combinación de los inhibidores bloqueó totalmente la fosforilación inducida por el complejo de vanadio(IV). Estos datos sugieren que habría un mecanismo, inducido por TreVO, mediado por radicales libres susceptibles a la mezcla de vitaminas E y C. Además, habría dos vías de transducción de señales involucradas en la activación de las ERKs por el complejo TreVO, la PI3-K y las MEKs. Dado que el PD98059 no bloqueó totalmente la acción de TreVO sobre las ERKs, los resultados sugieren que el complejo de trehalosa utilizaría una vía alternativa a MEK / ERK para fosforilar las ERKs.

En general, los investigadores utilizan altas dosis de vanadio (1 – 5 mM) para realizar los estudios de señalización intracelular, lo cual no siempre refleja las condiciones fisiológicas normales. En nuestro modelo de células MC3T3-E1 el grado de fosforilación basal de las ERKs es muy bajo, resultando un modelo sensible a los complejos de vanadio para inducir la fosforilación de las mismas. Utilizando el sistema de revelado por quimioluminiscencia se pudo observar los cambios en la fosforilación de las ERKs producidos por dosis mitogénicas de TreVO (25 μ M). Se repitieron nuevamente los ensayos de activación de las ERKs con 25 μ M de TreVO (Fig. 23) incluyendo la preincubación con los mismos inhibidores utilizados en los ensayos con 1 mM de TreVO. Los resultados encontrados fueron diferentes, la mezcla de vitaminas no bloqueó la fosforilación de las ERKs inducida con bajas dosis del complejo, sin embargo los inhibidores de PI3-K y MEKs bloquearon el efecto del TreVO. Los resultados obtenidos con 1 mM y 25 μ M de TreVO sugieren que altas dosis del complejo de vanadio generan radicales libres, susceptibles a las vitaminas E y C, que promueven la activación de las ERKs; pero que a bajas dosis (25 μ M) operaría un mecanismo diferente a la generación de radicales libres, probablemente a través de la inhibición directa de las PTPasas por TreVO. Además, dosis mitogénicas del complejo (25 μ M) también activan las ERKs por las dos vías antes mencionadas, PI3-K- y MEKs - ERKs.

Las ERKs se asocian con las señales mitogénicas de la insulina y de diferentes factores de crecimiento, por lo tanto es razonable pensar que si 25 μ M de TreVO activa las ERKs y promueve la proliferación de las células MC3T3-E1, estos procesos estén relacionados. Para investigar esta hipótesis se utilizaron los mismos inhibidores y mezcla de vitaminas antes mencionados, y se estudió el mecanismo de acción mitogénico del complejo TreVO. El PD98059 y la wortmanina bloquearon la acción mitogénica de TreVO, mientras que la mezcla de vitaminas E y C no modificó el efecto del complejo. Estos resultados sugieren que TreVO utilizaría la vía

de las ERKs y la PI3-K para ejercer sus efectos mitogénicos y esta acción no sería mediada por la generación de radicales libres susceptibles a la mezcla de vitaminas E y C. Estudios realizados en nuestro laboratorio muestran que el vanadato y derivados del vanadilo(IV) inducen la generación de radicales libres y la peroxidación lipídica en concentraciones superiores a 100 μM (Cortizo et al 2000, Molinuevo et al 2004). Los presentes resultados están de acuerdo con los reportados previamente por nuestro grupo de trabajo y sugieren que altas dosis de vanadio (mayores a 100 μM) inducirían la generación de radicales libres, mientras que bajas dosis (25 μM) no generarían un incremento significativo de los mismos, siendo los efectos de TreVO mediados fundamentalmente por la inhibición directa del vanadio sobre las PTPasas.

El mecanismo por el cual el vanadio estimula el consumo de glucosa en diferentes tipos celulares es un punto de interés para establecer las vías utilizadas para conducir sus acciones insulinomiméticas en células en cultivo. El complejo TreVO y la insulina estimulan el consumo de glucosa en los osteoblastos UMR106. Los mecanismos intracelulares de la insulina se han descrito en diferentes líneas celulares y en general todos coinciden en que es un efecto mediado fundamentalmente por la PI3-K. En el caso del vanadio este punto no está claro aún, pero se cree que utilizaría algunas de las vías de la insulina. Shisheva y Shechter (1993) investigaron el mecanismo por el cual el vanadio mediaría el consumo de glucosa en adipocitos y células de músculo. Ellos proponen la presencia de una nueva quinasa citosólica de 53 kDa, sensible a la inhibición por estaurosporina, la cual sería utilizada por el vanadio para ejercer algunos de los efectos insulinomiméticos. En nuestro sistema de osteoblastos en cultivo se investigó el efecto de la estaurosporina sobre el consumo de glucosa inducido por TreVO y la insulina en las células UMR106. La estaurosporina (1 μM) inhibió parcialmente el consumo de glucosa estimulado por la insulina, mientras que bloqueó totalmente el efecto del complejo (Fig. 25). Estos resultados concuerdan con los descritos por Shisheva y Shechter, sugiriendo que TreVO podría utilizar este tipo de quinasas para ejercer los efectos metabólicos en los osteoblastos UMR106. La estaurosporina es un inhibidor inespecífico, utilizado por muchos investigadores para inhibir la PKC. Por lo tanto, cabe preguntarse si el efecto metabólico de TreVO no podría también estar mediado por esta quinasa. Para tratar de dilucidar este punto se utilizó un éster de forbol, PMA, el cual tiene un efecto dual sobre la actividad de la PKC dependiendo de las condiciones de incubación (Quarles et al 1993). Luego de ajustar los tiempos y concentraciones de PMA para utilizarlo como inductor o inhibidor de la actividad de PKC, se realizaron los ensayos

correspondientes. El éster de forbol ($0,1 \mu\text{M}$) indujo el consumo de glucosa por los osteoblastos UMR106, sin embargo, cuando se preincubaron las células 16 horas con $0,5 \mu\text{M}$ PMA, ellas no respondieron luego a la incubación con $0,1 \mu\text{M}$ de PMA, sugiriendo que la activación de la PKC por el PMA promueve el consumo de glucosa y que la preincubación de 16 horas con PMA bloquea el consumo de glucosa mediado por PKC en las células UMR106. Para estudiar si el complejo utiliza la PKC para estimular el consumo de glucosa en los osteoblastos se preincubaron las células 16 horas con $0,5 \mu\text{M}$ de PMA y el efecto de TreVO sobre el consumo de glucosa no fue afectado por la preincubación con el éster de forbol, sugiriendo que el complejo de vanadio(IV) no utilizaría la vía de la PKC para estimular el consumo de glucosa en los osteoblastos UMR106.

Dado que el vanadio activa las vías utilizadas por la insulina, cabe preguntarse si el TreVO utiliza la vía de la PI3-K para estimular el consumo de glucosa en los osteoblastos UMR106. Para responder esta cuestión se utilizó la wortmanina como un inhibidor de la PI3-K y se observó que el efecto de TreVO fue revertido solo un 15 %, sugiriendo que la vía de la PI3-K no es la principal vía involucrada en el efecto metabólico del TreVO.

Tsiani y colaboradores (Tsiani et al 1998) encontraron que el consumo de glucosa estimulado por vanadato en células de músculo no es mediado por la PI3-K ni por la PKC, nuestros resultados concuerdan con los encontrados por estos investigadores. Por lo tanto, el consumo de glucosa estimulado por TreVO en osteoblastos en cultivo estaría mediado por una vía sensible a la estaurosporina.

Conclusiones

“*Y* daré fin a mis coplas
Con aire de relación;
Nunca falta un preguntón
Más curioso que mujer,
Y tal vez quiera saber
Cómo fue la conclusión.”

José Hernández. Verso 390

CONCLUSIONES

Se sintetizaron e identificaron diferentes complejos del catión vanadilo(IV) con monosacáridos, disacáridos, ácidos y alcoholes derivados de azúcares y compuestos relacionados.

Todos los complejos de vanadio(IV) estudiados en esta tesis (15) inhibieron la actividad específica de la fosfatasa alcalina intestinal y ósea con diferente potencia y eficacia dependiendo tanto de la enzima como del tipo de ligando.

Los complejos de vanadilo(IV) modularon la proliferación de dos líneas celulares osteoblásticas, una normal (MC3T3-E1) y otra tumoral (UMR106).

Los complejos de vanadio(IV) regularon de forma diferente dos marcadores de diferenciación osteoblástica: inhibieron la actividad específica de fosfatasa alcalina y aumentaron el contenido de colágeno.

Con excepción de los complejos con sorbitol y manitol, todos los compuestos de vanadio(IV) estimularon el consumo de glucosa por los osteoblastos UMR106.

Se encontraron cuatro complejos de vanadilo(IV) (FruVO, MalVO, LacVO y TreVO) con buenas propiedades insulinomiméticas, que no presentaron marcados efectos tóxicos en el rango de concentraciones bajas a medias. Por estas razones, estos compuestos son de interés para su potencial aplicación en el tratamiento de patologías como la Diabetes mellitus.

Además, se encontraron dos complejos de vanadilo(IV) (GluVO y TreVO) que inhibieron el crecimiento de las células tumorales en concentraciones que no afectaron significativamente la viabilidad de las células normales. Esta propiedad los convierte en candidatos a ser evaluados como potenciales agente antitumorales.

El complejo TreVO demostró propiedades osteogénicas: Estimuló la proliferación de las células MC3T3-E1, la producción de colágeno y el consumo de glucosa. Por último, favoreció la mineralización de la matriz extracelular a pesar de que inhibió la actividad específica de la fosfatasa alcalina. Este complejo es un buen candidato para ser evaluado tanto en el tratamiento de la Diabetes mellitus como en el de patologías que cursan con disminución de la masa ósea.

El complejo con trehalosa promovió la fosforilación de proteínas en restos de tirosina y en particular la de las ERKs de las células UMR106 y MC3T3-E1, en una forma dependiente del tiempo y la concentración.

Las células UMR106 poseen un mayor contenido basal de fosfo-ERKs que las células MC3T3-E1, siendo estas últimas un sistema más sensible para el estudio de la activación de las ERKs por el vanadio.

Altas dosis de TreVO (1 mM) activaron a las ERKs de las células MC3T3-E1 a través de la vía de las MEKs y de la PI3-K, participando de la activación un mecanismo sensible a la mezcla de vitaminas E y C.

Bajas dosis de TreVO (25 μ M) indujeron la fosforilación de las ERKs y estimularon la proliferación de las células MC3T3-E1 a través de la vía de las MEKs y de la PI3-K; ambos efectos no serían mediados por un mecanismo sensible a la mezcla de vitaminas E y C.

El consumo de glucosa estimulado por el complejo de vanadilo(IV) parece ser mediado por un mecanismo sensible a estaurosporina, mientras que las vías de las ERKs, la PI3-K y la PKC no estarían involucradas en este efecto.

Por todo lo anterior, el modelo experimental utilizado en este trabajo de tesis es un modelo sencillo y de buena sensibilidad para seleccionar compuestos de vanadio con potenciales aplicaciones terapéuticas.

En resumen, en esta tesis se estudió la bioactividad de una familia de complejos de vanadio(IV), encontrando compuestos con actividad insulinomimética y antitumoral más potentes y eficaces que su progenitor el vanadilo. Se realizaron por primera vez estudios a largo plazo sobre todas las etapas del desarrollo osteoblástico en células en cultivo, observándose un efecto osteogénico para el complejo con trehalosa (TreVO). Por último, se propone un mecanismo de acción para el efecto mitogénico de TreVO y se aportan nuevos hallazgos en el mecanismo utilizado por este compuesto para estimular el consumo de glucosa en los osteoblastos.

Referencias

“Mas naides se crea ofendido,
Pues a ninguno incomodo;
Y si canto de este modo
Por encontrarlo oportuno,
No es para mal de ninguno
Sino para bien de todos”

José Hernández. Verso 1193

REFERENCIAS

1. Abdel-Hafiz HA, Heasley LE, Kyriakis JM, Avruch J, Kroll DJ, Johnson GL, Hoeffler JP. 1992. Activating transcription factor-2 DNA-binding activity is stimulated by phosphorylation catalyzed by p42 and p54 microtubule-associated protein kinases. *Mol Endocrinol* 6(12):2079-89
2. Adachi M, Fukuda M, Nishida E. 1999. Two co-existing mechanisms for nuclear import of MAP kinase: passive diffusion of a monomer and active transport of a dimer. *EMBO J* 18(19):5347-58
3. Adachi M, Fukuda M, Nishida E. 2000. Nuclear export of MAP kinase (ERK) involves a MAP kinase kinase (MEK)-dependent active transport mechanism. *J Cell Biol* 148(5):849-56
4. Ahmad F, Azevedo JL, Cortright R, Do: hm GL, Goldstein BJ. 1997. Alterations in skeletal muscle protein-tyrosine phosphatase activity and expression in insulin-resistant human obesity and diabetes. *J Clin Invest* 100(2):449-58
5. al-Attas OS, al-Dagheri NM, Vigo NT. 1995. Vanadate enhances insulin-receptor binding in gestational diabetic human placenta. *Cell Biochem Funct* 13(1):9-14
6. Alessi DR, Gomez N, Moorhead G, Lewis T, Keyse SM, Cohen P. 1995. Inactivation of p42 MAP kinase by protein phosphatase 2A and a protein tyrosine phosphatase, but not CL100, in various cell lines. *Curr Biol* 5(3):283-95
7. Allan LA, Morrice N, Brady S, Magee G, Pathak S, Clarke PR. 2003. Inhibition of caspase-9 through phosphorylation at Thr 125 by ERK MAPK. *Nat Cell Biol* 5(7):647-54
8. Amarnani S, Merriman HL, Linkhart TA, Baylink DJ, Mohan S. 1993. Autocrine regulators of MC3T3-E1 cell proliferation. *J Bone Miner Res* 8(2):157-65
9. Anke M, Groppel B, and Krause U (1991). In *Trace Elements in Man and Animals*, Momciliovic B Ed. IMI, Zagreb, Vol 7, 11.9 - 11.10
10. Badmaev V, Prakash S, Majeed M. 1999. Vanadium: a review of its potential role in the fight against diabetes. *J Altern Complement Med* 5(3):273-91

11. Bae YS, Kang SW, Seo MS, Baines IC, Tekle E, Chock PB, Rhee SG. 1997. Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. Role in EGF receptor-mediated tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 272(1):217-21
12. Bailey CJ. 1992. Biguanides and NIDDM. *Diabetes Care* 15(6):755-72
13. Banting FG, Best CH, Collip JB, Campbell WR and Fletcher AA. 1922. Pancreatic extracts in the treatment of diabetes mellitus. *Can. Med. Assoc. J.* 12: 141-146
14. Baran EJ. 1995. *Química Bioinorgánica*. Ed Capella I. Madrid McGraw-Hill / Interamericana SA
15. Baran EJ. 2001. Oxovanadium(IV) Complexes of Carbohydrates. *J. Carbohydrate Chemistry*, 20(9):769-788.
16. Baratte B, Meijer L, Galaktionov K, Beach D. 1992. Screening for antimitotic compounds using the cdc25 tyrosine phosphatase, an activator of the mitosis-inducing p34cdc2/cyclin Bcdc13 protein kinase. *Anticancer Res* 12(3):873-80
17. Barrio DA, Braziunas MD, Etcheverry SB, Cortizo AM. 1997. Maltol complexes of vanadium (IV) and (V) regulate in vitro alkaline phosphatase activity and osteoblast-like cell growth. *J Trace Elem Med Biol* 11(2):110-5
18. Barrio DA, Williams PA, Cortizo AM, Etcheverry SB. 2003. Synthesis of a new vanadyl(IV) complex with trehalose (TreVO): insulin-mimetic activities in osteoblast-like cells in culture. *J Biol Inorg Chem* 8(4):459-68
19. Baylink DJ, Finkelman RD, Mohan S. 1993. Growth factors to stimulate bone formation. *J Bone Miner Res* 8 Suppl 2:S565-72
20. Bell RH Jr, Hye RJ. 1983. Animal models of diabetes mellitus: physiology and pathology. *J Surg Res* 35(5):433-60
21. Bernier M, Laird DM, Lane MD. 1988. Effect of vanadate on the cellular accumulation of pp15, an apparent product of insulin receptor tyrosine kinase action. *J Biol Chem* 263(27):13626-34

22. Bevan AP, Burgess JW, Yale JF, Drake PG, Lachance D, Baquiran G, Shaver A, Posner BI. 1995. In vivo insulin mimetic effects of pV compounds: role for tissue targeting in determining potency. *Am J Physiol* 268(1 Pt 1):E60-6
23. Blalock WL, Navolanic PM, Steelman LS, Shelton JG, Moye PW, Lee JT, Franklin RA, Mirza A, McMahon M, White MK, McCubrey JA. 2003a. Requirement for the PI3K/Akt pathway in MEK1-mediated growth and prevention of apoptosis: identification of an Achilles heel in leukemia. *Leukemia* 17(6):1058-67
24. Blank JL, Gerwins P, Elliott EM, Sather S, Johnson GL. 1996. Molecular cloning of mitogen-activated protein/ERK kinase kinases (MEKK) 2 and 3. Regulation of sequential phosphorylation pathways involving mitogen-activated protein kinase and c-Jun kinase. *J Biol Chem* 271(10):5361-8
25. Boden G, Chen X, Ruiz J, van Rossum GD, Turco S. 1996. Effects of vanadyl sulfate on carbohydrate and lipid metabolism in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism* 45(9):1130-5
26. Borchard U, Fox AA, Greeff K, Schlieper P. 1979. Negative and positive inotropic action of vanadate on atrial and ventricular myocardium. *Nature* 279(5711):339-41
27. Borgatti P, Martelli AM, Bellacosa A, Casto R, Massari L, Capitani S, Neri LM. 2000. Translocation of Akt/PKB to the nucleus of osteoblast-like MC3T3-E1 cells exposed to proliferative growth factors. *FEBS Lett* 477(1-2):27-32
28. Boulton TG, Nye SH, Robbins DJ, Ip NY, Radziejewska E, Morgenbesser SD, DePinho RA, Panayotatos N, Cobb MH, Yancopoulos GD. 1991. ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell* 65(4):663-75
29. Boulton TG, Yancopoulos GD, Gregory JS, Slaughter C, Moomaw C, Hsu J, Cobb MH. 1990. An insulin-stimulated protein kinase similar to yeast kinases involved in cell cycle control. *Science* 249(4964):64-7
30. Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-54

31. Brautigan DL, Bornstein P, Gallis B. 1981. Phosphotyrosyl-protein phosphatase. Specific inhibition by Zn. *J Biol Chem* 256(13):6519-22
32. Brichard SM, Bailey CJ, Henquin JC. 1990. Marked improvement of glucose homeostasis in diabetic ob/ob mice given oral vanadate. *Diabetes* 39(11):1326-32
33. Brichard SM, Henquin JC. 1995. The role of vanadium in the management of diabetes. *Trends Pharmacol Sci* 16(8):265-70
34. Brichard SM, Pottier AM, Henquin JC. 1989. Long term improvement of glucose homeostasis by vanadate in obese hyperinsulinemic fa/fa rats. *Endocrinology* 125(5):2510-6
35. Brown DJ, Gordon JA. 1984. The stimulation of pp60v-src kinase activity by vanadate in intact cells accompanies a new phosphorylation state of the enzyme. *J Biol Chem* 259(15):9580-6
36. Bruech M, Quintanilla ME, Legrum W, Koch J, Netter KJ, Fuhrmann GF. 1984. Effects of vanadate on intracellular reduction equivalents in mouse liver and the fate of vanadium in plasma, erythrocytes and liver. *Toxicology* 31(3-4):283-95
37. Brunet A, Roux D, Lenormand P, Dowd S, Keyse S, Pouyssegur J. 1999. Nuclear translocation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase is required for growth factor-induced gene expression and cell cycle entry. *EMBO J* 18(3):664-74
38. Burgering BM, Bos JL. 1995. Regulation of Ras-mediated signalling: more than one way to skin a cat. *Trends Biochem Sci* 20(1):18-22
39. Burgering BM, Pronk GJ, van Weeren PC, Chardin P, Bos JL. 1993. cAMP antagonizes p21ras-directed activation of extracellular signal-regulated kinase 2 and phosphorylation of mSos nucleotide exchange factor. *EMBO J* 12(11):4211-20
40. Byrne AR, Kosta L. 1978. Vanadium in foods and in human body fluids and tissues. *Sci Total Environ* 10(1):17-30
41. Cam MC, Li WM, McNeill JH. 1997. Partial preservation of pancreatic beta-cells by vanadium: evidence for long-term amelioration of diabetes. *Metabolism* 46(7):769-78
42. Camps M, Nichols A, Arkinstall S. 2000a. Dual specificity phosphatases: a gene family for control of MAP kinase function. *FASEB J* 14(1):6-16

43. Canalis E. 1985. Effect of sodium vanadate on deoxyribonucleic acid and protein syntheses in cultured rat calvariae. *Endocrinology* 116(3):855-62
44. Cantley LC Jr, Josephson L, Warner R, Yanagisawa M, Lechene C, Guidotti G. 1977. Vanadate is a potent (Na,K)-ATPase inhibitor found in ATP derived from muscle. *J Biol Chem* 252(21):7421-3
45. Cantley LC Jr, Resh MD, Guidotti G. 1978. Vanadate inhibits the red cell (Na⁺, K⁺) ATPase from the cytoplasmic side. *Nature* 272(5653):552-4
46. Carlson RM. 1975. Nuclear magnetic resonance spectrum of living tunicate blood cells and the structure of the native vanadium chromogen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72(6):2217-21
47. Cassel D, Zhuang YX, Glaser L. 1984. Vanadate stimulates Na⁺/H⁺ exchange activity in A431 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 118(2):675-81
48. Castro J, Maquedano A, Olive M. 1984. Lipid synthesis in isolated rat hepatocytes: activation by insulin and vanadate and inhibition by ouabain. *Biochem Int* 9(4):413-20
49. Cecchetti G, Gippaudo G, Valfre V, Satacatterina G. 1966. Vanadium and experimental caries. 2 Spectrochemical analysis of enamel in hamster and human teeth. *Ann Stomatol* 15: 161-167
50. Ciranni R, Antonetti M, Migliore L. 1995. Vanadium salts induce cytogenetic effects in in vivo treated mice. *Mutat Res* 343(1):53-60
51. Clutton S. 1997. The importance of oxidative stress in apoptosis. *Br Med Bull* 53(3):662-8
52. Cobb MH. 1999. MAP kinase pathways. *Prog Biophys Mol Biol* 71(3-4):479-500
53. Cohen N, Halbestam M, Shlimovich P, Chang CJ, Shamoon H, Rossetti L. 1995. Oral vanadyl sulfate improves hepatic and peripheral insulin sensitivity in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 95(6):2501-9
54. Cohen SE, Tseng YH, Michael MD, Kahn CR. 2004. Effects of insulin-sensitising agents in mice with hepatic insulin resistance. *Diabetologia* 47: 407-411
55. Cook SJ, McCormick F. 1993. Inhibition by cAMP of Ras-dependent activation of Raf. *Science* 262(5136):1069-72

56. Corbit KC, Foster DA, Rosner MR. 1999a. Protein kinase Cdelta mediates neurogenic but not mitogenic activation of mitogen-activated protein kinase in neuronal cells. *Mol Cell Biol* 19(6):4209-18
57. Cortizo AM, Caporossi M, Lettieri G, Etcheverry SB. 2000. Vanadate-induced nitric oxide production: role in osteoblast growth and differentiation. *Eur J Pharmacol* 400(2-3):279-85
58. Cortizo AM, Etcheverry SB. 1995. Vanadium derivatives act as growth factor--mimetic compounds upon differentiation and proliferation of osteoblast-like UMR106 cells. *Mol Cell Biochem* 145(2):97-102
59. Cortizo AM, Salice VC, Vescina CM, Etcheverry SB. 1997. Proliferative and morphological changes induced by vanadium compounds on Swiss 3T3 fibroblasts. *Biometals* 10(2):127-33
60. Cortizo MS, Alessandrini JL, Etcheverr SB, Cortizo AM. 2001. A vanadium/aspirin complex controlled release using a poly(beta-propiolactone) film. Effects on osteosarcoma cells. *J Biomater Sci Polym Ed* 12(9):945-59
61. Cowley S, Paterson H, Kemp P, Marshall CJ. 1994. Activation of MAP kinase kinase is necessary and sufficient for PC12 differentiation and for transformation of NIH 3T3 cells. *Cell* 77(6):841-52
62. Crans DC and Tracey A. 1998. The Chemistry of Vanadium in Aqueous and Nonaqueous Solution. En *Vanadium Compounds. Chemistry, Biochemistry, and Therapeutic Applications*, pp: 2-29. Editores Tracey A and Crans DC. American Chemical Society, Washington, DC
63. Crans DC, Bunch RL, Theisen LA. 1989. Interaction of Trace Levels of Vanadium(IV) and Vanadium(V) in Biological Systems. *J. Am. Chem. Soc.*, 111(19): 7597-7607.
64. Crans DC.1998. Peroxo, Hydroxylamino, and Acac Derived Vanadium Complexes: Chemistry, Biochemistry, and Insulin-Mimetic Actions of Selected Vanadium Compounds. En *Vanadium Compounds. Chemistry, Biochemistry, and Therapeutic Applications*, pp: 82-103. Editores Tracey A and Crans DC. American Chemical Society, Washington, DC
65. Crews CM, Alessandrini A, Erikson RL. 1992a. The primary structure of MEK, a protein kinase that phosphorylates the ERK gene product. *Science* 258(5081):478-80

66. Cruz TF, Morgan A, Min W. 1995. In vitro and in vivo antineoplastic effects of orthovanadate. *Mol Cell Biochem* 153(1-2):161-6
67. Cusi K, Consoli A, DeFronzo RA. 1996. Metabolic effects of metformin on glucose and lactate metabolism in noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 81(11):4059-67
68. Cusi K, Cukier S, DeFronzo RA, Torres M, Puchulu FM, Redondo JC. 2001. Vanadyl sulfate improves hepatic and muscle insulin sensitivity in type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 86(3):1410-7
69. Chang L, Karin M. 2001. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 410(6824):37-40
70. Chasteen ND, Lord EM, Thompson HJ, Grady JK. 1986. Vanadium complexes of transferrin and ferritin in the rat. *Biochim Biophys Acta* 884(1):84-92
71. Chasteen ND. 1995. Vanadium-Protein Interactions. En *Metal Ions in Biological Systems. Vanadium and its role in life*, pp 231 - 247. Editores: Sigel H and Sigel A. New York. Marcel Dekker, INC.
72. Chaudhary LR, Avioli LV. 1998. Identification and activation of mitogen-activated protein (MAP) kinase in normal human osteoblastic and bone marrow stromal cells: attenuation of MAP kinase activation by cAMP, parathyroid hormone and forskolin. *Mol Cell Biochem* 178(1-2):59-68
73. Cheatham B, Kahn CR. 1995. Insulin action and the insulin signaling network. *Endocr Rev* 16(2):117-42
74. Cheatham B, Vlahos CJ, Cheatham L, Wang L, Blenis J, Kahn CR. 1994. Phosphatidylinositol 3-kinase activation is required for insulin stimulation of pp70 S6 kinase, DNA synthesis, and glucose transporter translocation. *Mol Cell Biol* 14(7):4902-11
75. Chen J, Fujii K, Zhang L, Roberts T, Fu H. 2001. Raf-1 promotes cell survival by antagonizing apoptosis signal-regulating kinase 1 through a MEK-ERK independent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(14):7783-8

76. Chen RH, Juo PC, Curran T, Blenis J. 1996. Phosphorylation of c-Fos at the C-terminus enhances its transforming activity. *Oncogene* 12(7):1493-502
77. Chen YX, Yang DC, Brown AB, Jeng Y, Tatoyan A, Chan TM. 1990. Activation of a membrane-associated phosphatidylinositol kinase through tyrosine-protein phosphorylation by naphthoquinones and orthovanadate. *Arch Biochem Biophys* 283(1):184-92
78. Cheng A, Dube N, Gu F, Tremblay ML. 2002. Coordinated action of protein tyrosine phosphatases in insulin signal transduction. *Eur J Biochem* 269(4):1050-9
79. Chihara K, Sugimoto T. 1997. The action of GH/IGF-I/IGFBP in osteoblasts and osteoclasts. *Horm Res* 48 Suppl 5:45-9
80. Chu Y, Solski PA, Khosravi-Far R, Der CJ, Kelly K. 1996a. The mitogen-activated protein kinase phosphatases PAC1, MKP-1, and MKP-2 have unique substrate specificities and reduced activity in vivo toward the ERK2 sevenmaker mutation. *J Biol Chem* 271(11):6497-501
81. Dai S, McNeill JH. 1994a. One-year treatment of non-diabetic and streptozotocin-diabetic rats with vanadyl sulphate did not alter blood pressure or haematological indices. *Pharmacol Toxicol* 74(2):110-5
82. Dai S, Thompson KH, McNeill JH. 1994b. One-year treatment of streptozotocin-induced diabetic rats with vanadyl sulphate. *Pharmacol Toxicol* 74(2):101-9
83. Dai S, Thompson KH, Vera E, McNeill JH. 1994c. Toxicity studies on one-year treatment of non-diabetic and streptozotocin-diabetic rats with vanadyl sulphate. *Pharmacol Toxicol* 75(5):265-73
84. Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME. 1997. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91(2):231-41
85. Davis RJ. 1993. The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem* 268(20):14553-6
86. Davison AJ, Stern A, Fatur DJ, Tsang SS. 1991. Vanadate stimulates ornithine decarboxylase activity in C3H/10T1/2 cells. *Biochem Int* 24(3):461-6

87. DCCT (Diabetes Control and Complications Trial Research Group) 1993. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 329: 977-986
88. D'Cruz OJ, Uckun FM. 2002. Metvan: a novel oxovanadium(IV) complex with broad spectrum anticancer activity. *Expert Opin Investig Drugs* 11(12):1829-36
89. de la Torre A, Granero S, Mayayo E, Corbella J, Domingo JL. 1999. Effect of age on vanadium nephrotoxicity in rats. *Toxicol Lett* 105(1):75-82
90. de Vries-Smits AM, Burgering BM, Leervers SJ, Marshall CJ, Bos JL. 1992. Involvement of p21ras in activation of extracellular signal-regulated kinase 2. *Nature* 357(6379):602-4
91. Dehghani GA, Ahmadi S, Omrani GR. 1997. Effects of vanadyl sulphate on glucose homeostasis in severe diabetes induced by streptozotocin in rats. *Indian J Med Res* 106:481-5
92. Delfert DM, McDonald JM. 1985. Vanadyl and vanadate inhibit Ca^{2+} transport systems of the adipocyte plasma membrane and endoplasmic reticulum. *Arch Biochem Biophys* 241(2):665-72
93. Dent P, Campbell DG, Caudwell FB, Cohen P. 1990. Identification of three in vivo phosphorylation sites on the glycogen-binding subunit of protein phosphatase 1 from rabbit skeletal muscle, and their response to adrenaline. *FEBS Lett* 259(2):281-5
94. Dent P, Haser W, Haystead TA, Vincent LA, Roberts TM, Sturgill TW. 1992. Activation of mitogen-activated protein kinase kinase by v-Raf in NIH 3T3 cells and in vitro. *Science* 257(5075):1404-7
95. Denton RM y Tavaré JM. 1997. Molecular Basis of Insulin Actions on Intracellular Metabolism. En *Intyernational Textbook of Diabetes Mellitus*, Segunda ed., pp: 437-467. Editores Albeti KGMM, Zimmet P, DeFronzo RA and Keen H (Honorary). John Wiley & Sons Ltd.
96. Dimond EG, Caravaca J, Benchimol A. 1963. Vanadium, Excretion, toxicity, lipid effect in man. *Am J Clin Nutr* 12:49-53
97. Djordjevic C, Wampler GL. 1985. Antitumor activity and toxicity of peroxo heteroligand vanadates(V) in relation to biochemistry of vanadium. *J Inorg Biochem* 25(1):51-5

98. Djordjevic C. 1995. Antitumor Activity of Vanadium Compounds. En Metal Ions in Biological Systems. Vanadium and its role in life, pp 595-615. Editores: Sigel H and Sigel A. New York. Marcel Dekker, INC.
99. Domingo JL, Gomez M, Sanchez DJ, Llobet JM, Keen CL. 1995. Toxicology of vanadium compounds in diabetic rats: the action of chelating agents on vanadium accumulation. *Mol Cell Biochem* 153(1-2):233-40
100. Domingo JL, Llobet JM, Tomas JM, Corbella J. 1985. Short-term toxicity studies of vanadium in rats. *J Appl Toxicol* 5(6):418-21
101. Domingo JL. 1996. Vanadium: a review of the reproductive and developmental toxicity. *Reprod Toxicol* 10(3):175-82
102. Domingo JL. 2000. Vanadium and diabetes. What about vanadium toxicity? *Mol Cell Biochem* 203(1-2):185-7
103. D'Onofrio F, Le MQ, Chiasson JL, Srivastava AK. 1994. Activation of mitogen activated protein (MAP) kinases by vanadate is independent of insulin receptor autophosphorylation. *FEBS Lett* 340(3):269-75
104. Downward J. 1998. Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt. *Curr Opin Cell Biol* 10(2):262-7
105. Dreosti IE. 1993. Recommended dietary intakes of iron, zinc, and other inorganic nutrients and their chemical form and bioavailability. *Nutrition* 9(6):542-5
106. Dubyak GR, Kleinzeller A. 1980. The insulin-mimetic effects of vanadate in isolated rat adipocytes. Dissociation from effects of vanadate as a (Na⁺-K⁺)ATPase inhibitor. *J Biol Chem* 255(11):5306-12
107. Dunn FL, Nathan DM, Scavini M, Selam JL, Wingrove TG. 1997. Long-term therapy of IDDM with an implantable insulin pump. The Implantable Insulin Pump Trial Study Group. *Diabetes Care* 20(1):59-63
108. Edwards JG, Campbell G, Grierson AW, Kinn SR. 1991. Vanadate inhibits both intercellular adhesion and spreading on fibronectin of BHK21 cells and transformed derivatives. *J Cell Sci* 98 (Pt 3):363-8

109. Eldar-Finkelman H, Krebs EG. 1997a. Phosphorylation of insulin receptor substrate 1 by glycogen synthase kinase 3 impairs insulin action. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(18):9660-4
110. Eldar-Finkelman H, Seger R, Vandenheede JR, Krebs EG. 1995. Inactivation of glycogen synthase kinase-3 by epidermal growth factor is mediated by mitogen-activated protein kinase/p90 ribosomal protein S6 kinase signaling pathway in NIH/3T3 cells. *J Biol Chem* 270(3):987-90
111. Eldar-Finkelman H. 2002. Glycogen synthase kinase 3: an emerging therapeutic target. *Trends Mol Med* 8(3):126-32
112. Enslen H, Davis RJ. 2001. Regulation of MAP kinases by docking domains. *Biol Cell* 93(1-2):5-14
113. Erhardt P, Schremser EJ, Cooper GM. 1999a. B-Raf inhibits programmed cell death downstream of cytochrome c release from mitochondria by activating the MEK/Erk pathway. *Mol Cell Biol* 19(8):5308-15
114. Etcheverry SB and Cortizo AM. 1998. Vanadium Bioactivity on Cells in Culture. En *Vanadium Compounds. Chemistry, Biochemistry, and Therapeutic Applications*, pp: 270-276. Editores Tracey A and Crans DC. American Chemical Society, Washington, DC
115. Etcheverry SB, Apella MC, Baran EJ. 1984. A model study of the incorporation of vanadium in bone. *J Inorg Biochem* 20(4):269-74
116. Etcheverry SB, Williams PA, Barrio DA, Salice VC, Ferrer EG, Cortizo AM. 2000. Synthesis, characterization and bioactivity of a new VO₂⁺/aspirin complex. *J Inorg Biochem* 80(1-2):169-71
117. Etcheverry SB, Barrio DA, Cortizo AM, Williams PA. 2002a. Three new vanadyl(IV) complexes with non-steroidal anti-inflammatory drugs (Ibuprofen, Naproxen and Tolmetin). Bioactivity on osteoblast-like cells in culture. *J Inorg Biochem* 88(1):94-100
118. Etcheverry SB, Williams PA, Salice VC, Barrio DA, Ferrer EG, Cortizo AM. 2002b. Biochemical properties and mechanism of action of a vanadyl(IV)-aspirin complex on bone cell lines in culture. *Biometals* 15(1):37-49

119. Etcheverry SB, Barrio DA, Williams PA, Baran EJ. 2001. On the interaction of the vanadyl(IV) cation with lactose: inhibition effects of vanadyl(IV)/monosaccharide and disaccharide complexes upon alkaline phosphatase activity. *Biol Trace Elem Res* 84(1-3):227-38
120. Etcheverry SB, Crans DC, Keramidas AD, Cortizo AM. 1997. Insulin-mimetic action of vanadium compounds on osteoblast-like cells in culture. *Arch Biochem Biophys* 338(1):7-14
121. Evangelou AM. 2002. Vanadium in cancer treatment. *Crit Rev Oncol Hematol* 42(3):249-65
122. Expert Committee for the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus of the American Diabetes Association . 1997. Report of the Expert Committee for the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 20: 1-15.
123. Fagin JA, Ikejiri K, Levin SR. 1987. Insulinotropic effects of vanadate. *Diabetes* 36(12):1448-52
124. Fantl WJ, Muslin AJ, Kikuchi A, Martin JA, MacNicol AM, Gross RW, Williams LT. 1994. Activation of Raf-1 by 14-3-3 proteins. *Nature* 371(6498):612-4
125. Fantus IG, Deragon G, Lai R and Tang S. 1995. Modulation of Insulin Action by Vanadate: Evidence of a role for phosphotyrosine phosphatase activity to alter cellular signaling. *Molecular and Cellular Biochemistry* 153: 103-112
126. Fantus IG, George R, Tang S, Chong P, Poznansky MJ. 1996. The insulin-mimetic agent vanadate promotes receptor endocytosis and inhibits intracellular ligand-receptor degradation by a mechanism distinct from the lysosomotropic agents. *Diabetes* 45(8):1084-93
127. Fantus IG, Kadota S, Deragon G, Foster B, Posner BI. 1989. Pervanadate. *Biochemistry* 28(22):8864-71
128. Farinelli SE, Greene LA. 1996. Cell cycle blockers mimosine, ciclopirox, and deferoxamine prevent the death of PC12 cells and postmitotic sympathetic neurons after removal of trophic support. *J Neurosci* 16(3):1150-62
129. Farley JR, Puzas JE, Baylink DJ. 1982. Effect of skeletal alkaline phosphatase inhibitors on bone cell proliferation in vitro. *Miner Electrolyte Metab* 7(6):316-23

130. Faure R, Vincent M, Dufour M, Shaver A, Posner BI. 1995. Arrest at the G2/M transition of the cell cycle by protein-tyrosine phosphatase inhibition: studies on a neuronal and a glial cell line. *J Cell Biochem* 59(3):389-401
131. Ferrell JE Jr, Bhatt RR. 1997. Mechanistic studies of the dual phosphorylation of mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 272(30):19008-16
132. Ferrell JE Jr. 1999. Building a cellular switch: more lessons from a good egg. *Bioessays* 21(10):866-70
133. Foltz IN, Gerl RE, Wieler JS, Luckach M, Salmon RA, Schrader JW. 1998. Human mitogen-activated protein kinase kinase 7 (MKK7) is a highly conserved c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase (JNK/SAPK) activated by environmental stresses and physiological stimuli. *J Biol Chem* 273(15):9344-51
134. Force T, Bonventre JV, Heidecker G, Rapp U, Avruch J, Kyriakis JM. 1994. Enzymatic characteristics of the c-Raf-1 protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(4):1270-4
135. Franceschi RT, Iyer BS. 1992. Relationship between collagen synthesis and expression of the osteoblast phenotype in MC3T3-E1 cells. *J Bone Miner Res* 7(2):235-46
136. Freed E, Symons M, Macdonald SG, McCormick F, Ruggieri R. 1994. Binding of 14-3-3 proteins to the protein kinase Raf and effects on its activation. *Science* 265(5179):1713-6
137. Frodin M, Gammeltoft S. 1999. Role and regulation of 90 kDa ribosomal S6 kinase (RSK) in signal transduction. *Mol Cell Endocrinol* 151(1-2):65-77
138. Frodin M, Peraldi P, Van Obberghen E. 1994. Cyclic AMP activates the mitogen-activated protein kinase cascade in PC12 cells. *J Biol Chem* 269(8):6207-14
139. Frost JA, Steen H, Shapiro P, Lewis T, Ahn N, Shaw PE, Cobb MH. 1997. Cross-cascade activation of ERKs and ternary complex factors by Rho family proteins. *EMBO J* 16(21):6426-38
140. Fu H, Subramanian RR, Masters SC. 2000. 14-3-3 proteins: structure, function, and regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40:617-47

141. Fukuda M, Gotoh Y, Nishida E. 1997. Interaction of MAP kinase with MAP kinase kinase: its possible role in the control of nucleocytoplasmic transport of MAP kinase. *EMBO J* 16(8):1901-8
142. Fukuda M, Gotoh Y, Tachibana T, Dell K, Hattori S, Yoneda Y, Nishida E. 1995. Induction of neurite outgrowth by MAP kinase in PC12 cells. *Oncogene* 11(2):239-44
143. Gherzi R, Caratti C, Andraghetti G, Bertolini S, Montemurro A, Sesti G, Cordera R. 1988. Direct modulation of insulin receptor protein tyrosine kinase by vanadate and anti-insulin receptor monoclonal antibodies. *Biochem Biophys Res Commun* 152(3):1474-80
144. Gibson S, Widmann C, Johnson GL. 1999. Differential involvement of MEK kinase 1 (MEKK1) in the induction of apoptosis in response to microtubule-targeted drugs versus DNA damaging agents. *J Biol Chem* 274(16):10916-22
145. Goldfine AB, Simonson DC, Folli F, Patti ME, Kahn CR. 1995a. Metabolic effects of sodium metavanadate in humans with insulin-dependent and noninsulin-dependent diabetes mellitus in vivo and in vitro studies. *J Clin Endocrinol Metab* 80(11):3311-20
146. Goldfine AB, Simonson DC, Folli F, Patti ME, Kahn CR. 1995b. In vivo and in vitro studies of vanadate in human and rodent diabetes mellitus. *Mol Cell Biochem* 153(1-2):217-31
147. Goldfine AB, Willsky G, and Kahn CR. 1998. Vanadium Salts in the Treatment of Human Diabetes Mellitus. En *Vanadium Compounds. Chemistry, biochemistry, and therapeutic applications*, pp: 353 - 368. Editores: Tracey AS and Crans DC. Washington, DC. American Chemical Society.
148. Gopalbhai K, Meloche S. 1998. Repression of mitogen-activated protein kinases ERK1/ERK2 activity by a protein tyrosine phosphatase in rat fibroblasts transformed by upstream oncoproteins. *J Cell Physiol* 174(1):35-47
149. Grammer TC, Blenis J. 1997. Evidence for MEK-independent pathways regulating the prolonged activation of the ERK-MAP kinases. *Oncogene* 14(14):1635-42
150. Grant CV, Geiser-Bush KM, Cornman CR, Britt RD. 1999. Probing the Molecular Geometry of Five-Coordinate Vanadyl Complexes with Pulsed ENDOR. *Inorg Chem* 38(26):6285-8

151. Green A. 1986. The insulin-like effect of sodium vanadate on adipocyte glucose transport is mediated at a post-insulin-receptor level. *Biochem J* 238(3):663-9
152. Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW. 1994. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 74(6):1141-8
153. Grimes CA, Jope RS. 2001. CREB DNA binding activity is inhibited by glycogen synthase kinase-3 beta and facilitated by lithium. *J Neurochem* 78(6):1219-32
154. Grinstein S, Furuya W, Lu DJ, Mills GB. 1990. Vanadate stimulates oxygen consumption and tyrosine phosphorylation in electroporabilized human neutrophils. *J Biol Chem* 265(1):318-27
155. Groom LA, Sneddon AA, Alessi DR, Dowd S, Keyse SM. 1996. Differential regulation of the MAP, SAP and RK/p38 kinases by Pyst1, a novel cytosolic dual-specificity phosphatase. *EMBO J* 15(14):3621-32 (Abstr.)
156. Gunn-Moore FJ, Williams AG, Toms NJ, Tavaré JM. 1997. Activation of mitogen-activated protein kinase and p70S6 kinase is not correlated with cerebellar granule cell survival. *Biochem J* 324 (Pt 2):365-9
157. Guyton KZ, Liu Y, Gorospe M, Xu Q, Holbrook NJ. 1996. Activation of mitogen-activated protein kinase by H₂O₂. Role in cell survival following oxidant injury. *J Biol Chem* 271(8):4138-42
158. Hagemann C, Blank JL. 2001. The ups and downs of MEK kinase interactions. *Cell Signal* 13(12):863-75
159. Hagemann C, Rapp UR. 1999. Isotype-specific functions of Raf kinases. *Exp Cell Res* 253(1):34-46
160. Haider SS, Abdel-Gayoum AA, el-Fakhri M, Ghwarsha KM. 1998. Effect of selenium on vanadium toxicity in different regions of rat brain. *Hum Exp Toxicol* 17(1):23-8
161. Halberstam M, Cohen N, Shlimovich P, Rossetti L, Shamon H. 1996. Oral vanadyl sulfate improves insulin sensitivity in NIDDM but not in obese nondiabetic subjects. *Diabetes* 45(5):659-66

162. Hamaguchi T, Sudo T, Osada H. 1995. RK-682, a potent inhibitor of tyrosine phosphatase, arrested the mammalian cell cycle progression at G1phase. *FEBS Lett* 372(1):54-8
163. Han J, Lee JD, Jiang Y, Li Z, Feng L, Ulevitch RJ. 1996. Characterization of the structure and function of a novel MAP kinase kinase (MKK6). *J Biol Chem* 271(6):2886-91
164. Hanauske U, Hanauske AR, Marshall MH, Muggia VA, Von Hoff DD. 1987. Biphasic effect of vanadium salts on in vitro tumor colony growth. *Int J Cell Cloning* 5(2):170-8
165. Hei YJ, Chen X, Pelech SL, Diamond J, McNeill JH. 1995. Skeletal muscle mitogen-activated protein kinases and ribosomal S6 kinases. Suppression in chronic diabetic rats and reversal by vanadium. *Diabetes* 44(10):1147-55
166. Heinz A, Robinson KA, Grantham JJ. 1982. The transport and accumulation of oxyvanadium compounds in human erythrocytes in vitro. *J Lab Clin Med* 100(4):593-612
167. Heyliger CE, Tahiliani AG, McNeill JH. 1985. Effect of vanadate on elevated blood glucose and depressed cardiac performance of diabetic rats. *Science* 227(4693):1474-7
168. Hilsted J, Madsbad S, Hvidberg A, Rasmussen MH, Krarup T, Ipsen H, Hansen B, Pedersen M, Djurup R, Oxenboll B. 1995. Intranasal insulin therapy: the clinical realities. *Diabetologia* 38(6):680-4
169. Hiort C, Goodisman J, Dabrowiak JC. 1995. Chemically and photochemically initiated DNA cleavage by an insulin-mimetic bisperoxovanadium complex. *Mol Cell Biochem* 153(1-2):31-6
170. Hock JM, Centrella M, Canalis E. 1988. Insulin-like growth factor-I has independent effect on bone matrix formation and cell replication. *Endocrinology* 122: 254-259.
171. Hoeflich KP, Luo J, Rubie EA, Tsao MS, Jin O, Woodgett JR. 2000. Requirement for glycogen synthase kinase-3 β in cell survival and NF- κ B activation. *Nature* 406(6791):86-90
172. Hofmann CA, Colca JR. 1992. New oral thiazolidinedione antidiabetic agents act as insulin sensitizers. *Diabetes Care* 15(8):1075-8
173. Holleman F, Hoekstra JB. 1997. Insulin lispro. *N Engl J Med* 337(3):176-83

174. Hopkins LL Jr, Mohr HE. 1974. Proceedings: Vanadium as an essential nutrient. *Fed Proc* 33(6):1773-5
175. Hopkins LL Jr, Tilton BE. 1966. Metabolism of trace amounts of vanadium 48 in rat organs and liver subcellular particles. *Am J Physiol* 211(1):169-72
176. Horlein D, Gallis B, Brautigan DL, Bornstein P. 1982. Partial purification and characterization of phosphotyrosyl-protein phosphatase from Ehrlich ascites tumor cells. *Biochemistry* 21(22):5577-84
177. Huang CY, Ferrell JE Jr. 1996. Ultrasensitivity in the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(19):10078-83
178. Hunter T. 1995. Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* 80(2):225-36
179. Huyer G, Liu S, Kelly J, Moffat J, Payette P, Kennedy B, Tsaprailis G, Gresser MJ, Ramachandran C. 1997. Mechanism of inhibition of protein-tyrosine phosphatases by vanadate and pervanadate. *J Biol Chem* 272(2):843-51
180. Ida M, Imai K, Hashimoto S, Kawashima H. 1996. Pervanadate stimulation of wortmannin-sensitive and -resistant 2-deoxyglucose transport in adipocytes. *Biochem Pharmacol* 51(8):1061-7
181. Ituarte EA, Halstead LR, Iida-Klein A, Ituarte HG, Hahn TJ. 1989. Glucose transport system in UMR-106-01 osteoblastic osteosarcoma cells: regulation by insulin. *Calcif Tissue Int* 45(1):27-33
182. Jaumot M, Hancock JF. 2001. Protein phosphatases 1 and 2A promote Raf-1 activation by regulating 14-3-3 interactions. *Oncogene* 20(30):3949-58
183. Jin W, Wu L, Liang K, Liu B, Lu Y, Fan Z. 2003. Roles of the PI-3K and MEK pathways in Ras-mediated chemoresistance in breast cancer cells. *Br J Cancer* 89(1):185-91
184. Johannesen J, Petersen KF, Berger M, Binder C. 1997. New insulins and other possible therapeutic approaches. *Diabetologia* 40 Suppl 3:B89-93

185. Jones DH, Ley S, Aitken A. 1995. Isoforms of 14-3-3 protein can form homo- and heterodimers in vivo and in vitro: implications for function as adapter proteins. *FEBS Lett* 368(1):55-8
186. Kadota S, Fantus IG, Deragon G, Guyda HJ, Hersh B, Posner BI. 1987. Peroxide(s) of vanadium: a novel and potent insulin-mimetic agent which activates the insulin receptor kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 147(1):259-66
187. Kahn C, Seuwen K, Meloche S, Pouyssegur J. 1992. Coordinate, biphasic activation of p44 mitogen-activated protein kinase and S6 kinase by growth factors in hamster fibroblasts. Evidence for thrombin-induced signals different from phosphoinositide turnover and adenylylcyclase inhibition. *J Biol Chem* 267(19):13369-75
188. Kahn C. 1997. Insulin Receptor and Insulin Signaling in Normal and Disease States. En *Intyernational Textbook of Diabetes Mellitus*, Segunda ed., pp: 437-467. Editores Albeti KGMM, Zimmet P, DeFronzo RA and Keen H (Honorary). John Wiley & Sons Ltd.
189. Kamata H, Tanaka C, Yagisawa H, Matsuda S, Gotoh Y, Nishida E, Hirata H. 1996. Suppression of nerve growth factor-induced neuronal differentiation of PC12 cells. N-acetylcysteine uncouples the signal transduction from ras to the mitogen-activated protein kinase cascade. *J Biol Chem* 271(51):33018-25
190. Kanai F, Ito K, Todaka M, Hayashi H, Kamohara S, Ishii K, Okada T, Hazeki O, Ui M, Ebina Y. 1993. Insulin-stimulated GLUT4 translocation is relevant to the phosphorylation of IRS-1 and the activity of PI3-kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 195(2):762-8
191. Kano J, Sugimoto T, Fukase M, Chihara K. 1994. Direct involvement of cAMP-dependent protein kinase in the regulation of alkaline phosphatase activity by parathyroid hormone (PTH) and PTH-related peptide in osteoblastic UMR-106 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 199(1):271-6
192. Kato Y, Iwamoto M, Koike T, Suzuki F. 1987. Effect of vanadate on cartilage-matrix proteoglycan synthesis in rabbit costal chondrocyte cultures. *J Cell Biol* 104(2):311-9
193. Kawane T, Horiuchi N. 1999. Insulin-like growth factor I suppresses parathyroid hormone (PTH)/PTH-related protein receptor expression via a mitogen-activated protein kinase pathway in UMR-106 osteoblast-like cells. *Endocrinology* 140(2):871-9

194. Kenyon NS, Chatzipetrou M, Masetti M, Ranuncoli A, Oliveira M, Wagner JL, Kirk AD, Harlan DM, Burkly LC, Ricordi C. 1999. Long-term survival and function of intrahepatic islet allografts in rhesus monkeys treated with humanized anti-CD154. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(14):8132-7
195. Kenyon NS, Ranuncoli A, Masetti M, Chatzipetrou M, Ricordi C. 1998. Islet transplantation: present and future perspectives. *Diabetes Metab Rev* 14(4):303-13
196. Keyse SM. 1995a. An emerging family of dual specificity MAP kinase phosphatases. *Biochim Biophys Acta* 1265(2-3):152-60
197. Keyse SM. 1995b. Tyrosine kinase inhibition: an approach to drug development. *Hum Exp Toxicol* 14(7):618-9
198. Keyse SM. 2000. Protein phosphatases and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling *Current Opinion in Cell Biology*. 12: 186-192.
199. Khokhlatchev AV, Canagarajah B, Wilsbacher J, Robinson M, Atkinson M, Goldsmith E, Cobb MH. 1998. Phosphorylation of the MAP kinase ERK2 promotes its homodimerization and nuclear translocation. *Cell* 93(4):605-15
200. Kolch W, Heidecker G, Kochs G, Hummel R, Vahidi H, Mischak H, Finkenzeller G, Marme D, Rapp UR. 1993. Protein kinase C alpha activates RAF-1 by direct phosphorylation. *Nature* 364(6434):249-52
201. Kosako H, Gotoh Y, Matsuda S, Ishikawa M, Nishida E. 1992. Xenopus MAP kinase activator is a serine/threonine/tyrosine kinase activated by threonine phosphorylation. *EMBO J* 11(8):2903-8
202. Kozawa O, Takatsuki K, Kotake K, Yoneda M, Oiso Y, Saito H. 1989. Possible involvement of protein kinase C in proliferation and differentiation of osteoblast-like cells. *FEBS Lett* 243(2):183-5
203. Krady MM, Freyermuth S, Rogue P, Malviya AN. 1997. Pervanadate elicits proliferation and mediates activation of mitogen-activated protein (MAP) kinase in the nucleus. *FEBS Lett* 412(3):420-4

204. Kubena LF, Phillips TD. 1983. Toxicity of vanadium in female Leghorn chickens. *Poult Sci* 62(1):47-50
205. Kustin K. 1998. Perspectives on Vanadium Biochemistry. En *Vanadium Compounds. Chemistry, Biochemistry, and Therapeutic Applications*, pp: 170-185. Editores Tracey A and Crans DC. American Chemical Society, Washington, DC
206. Kwong DW, Chan OY, Wong RN, Musser SM, Vaca L, Chan SI. 1997. DNA-Photocleavage Activities of Vanadium(V)-Peroxo Complexes. *Inorg Chem* 36(7):1276-7
207. Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259):680-5
208. Lau KH, Tanimoto H, Baylink DJ. 1988. Vanadate stimulates bone cell proliferation and bone collagen synthesis in vitro. *Endocrinology* 123(6):2858-67
209. Le Marchand-Brustel Y, Gautier N, Cormont M, Van Obberghen E. 1995. Wortmannin inhibits the action of insulin but not that of okadaic acid in skeletal muscle: comparison with fat cells. *Endocrinology* 136(8):3564-70
210. Lebovitz HE. 1998. α -Glucosidase inhibitors as agent in the treatment of diabetes. *Diabetes Review* 6: 132-145
211. Lebovitz HE. 1999. Insulin secretagogues: old and new. *Diabetes Review* : 139-153
212. Lee WL and Zinman B. 1998. From insulin to insulin analogs: Progress in the treatment of type 1 diabetes. *Diabetes Review* 6: 73-88
213. Lenormand P, Brondello JM, Brunet A, Pouyssegur J. 1998. Growth factor-induced p42/p44 MAPK nuclear translocation and retention requires both MAPK activation and neosynthesis of nuclear anchoring proteins. *J Cell Biol* 142(3):625-33
214. Leonard A, Gerber GB. 1994. Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of vanadium compounds. *Mutat Res* 317(1):81-8
215. Lev S, Moreno H, Martinez R, Canoll P, Peles E, Musacchio JM, Plowman GD, Rudy B, Schlessinger J. 1995. Protein tyrosine kinase PYK2 involved in Ca^{2+} -induced regulation of ion channel and MAP kinase functions. *Nature* 376(6543):737-45

216. Lewis TS, Shapiro PS, Ahn NG. 1998. Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv Cancer Res* 74:49-139
217. Liao K, Lane MD. 1995. The blockade of preadipocyte differentiation by protein-tyrosine phosphatase HA2 is reversed by vanadate. *J Biol Chem* 270(20):12123-32
218. Liochev SI, Fridovich I. 1990. Vanadate-stimulated oxidation of NAD(P)H in the presence of biological membranes and other sources of O₂⁻. *Arch Biochem Biophys* 279(1):1-7
219. Liu Y, Guyton KZ, Gorospe M, Xu Q, Lee JC, Holbrook NJ. 1996. Differential activation of ERK, JNK/SAPK and P38/CSBP/RK map kinase family members during the cellular response to arsenite. *Free Radic Biol Med* 21(6):771-81
220. Lowenstein EJ, Daly RJ, Batzer AG, Li W, Margolis B, Lammers R, Ullrich A, Skolnik EY, Bar-Sagi D, Schlessinger J. 1992. The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling. *Cell* 70(3):431-42
221. Lyonnet B.M. and Martin E. *Presse Med.* 1, 191-192, 1899.
222. Llobet JM, Domingo JL. 1984. Acute toxicity of vanadium compounds in rats and mice. *Toxicol Lett* 23(2):227-31
223. Macara IG, Kustin K, Cantley LC Jr. 1980. Glutathione reduces cytoplasmic vanadate. Mechanism and physiological implications. *Biochim Biophys Acta* 629(1):95-106
224. Mahadev K, Wu X, Zilbering A, Zhu L, Lawrence JT, Goldstein BJ. 2001. Hydrogen peroxide generated during cellular insulin stimulation is integral to activation of the distal insulin signaling cascade in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 276(52):48662-9
225. Mamane Y, Pirrone N. 1998. Vanadium in the Atmosphere. Vanadium in the Environment. *Chemistry and biochemistry*, 30: 37 - 72. Editor: Nriagu JO. New York Wiley J & Sons, INC
226. Mansour SJ, Resing KA, Candi JM, Hermann AS, Gloor JW, Herskind KR, Wartmann M, Davis RJ, Ahn NG. 1994. Mitogen-activated protein (MAP) kinase phosphorylation of MAP kinase kinase: determination of phosphorylation sites by mass spectrometry and site-directed mutagenesis. *J Biochem (Tokyo)* 116(2):304-14

227. Marchisio PC, D'Urso N, Comoglio PM, Giancotti FG, Tarone G. 1988. Vanadate-treated baby hamster kidney fibroblasts show cytoskeleton and adhesion patterns similar to their Rous sarcoma virus-transformed counterparts. *J Cell Biochem* 37(2):151-9
228. Markussen J, Havelund S, Kurtzhals P, Andersen AS, Halstrom J, Hasselager E, Larsen UD, Ribel U, Schaffer L, Vad K, Jonassen I. 1996. Soluble, fatty acid acylated insulins bind to albumin and show protracted action in pigs. *Diabetologia* 39(3):281-8
229. Marona RA. 1995. Pobabilidad y estadistica elemental. Editrial Exacta, La Plata, Argentina.
230. Marshall M. 1995. Interactions between Ras and Raf: key regulatory proteins in cellular transformation. *Mol Reprod Dev* 42(4):493-9
231. Martelli AM, Borgatti P, Bortul R, Manfredini M, Massari L, Capitani S, Neri LM. 2000. Phosphatidylinositol 3-kinase translocates to the nucleus of osteoblast-like MC3T3-E1 cells in response to insulin-like growth factor I and platelet-derived growth factor but not to the proapoptotic cytokine tumor necrosis factor alpha. *J Bone Miner Res* 15(9):1716-30
232. Matsubara T, Musat-Marcu S, Misra HP, Dhalla NS. 1995. Protective effect of vanadate on oxyradical-induced changes in isolated perfused heart. *Mol Cell Biochem* 153(1-2):79-85
233. May JM, de Haen C. 1979. The insulin-like effect of hydrogen peroxide on pathways of lipid synthesis in rat adipocytes. *J Biol Chem* 254(18):9017-21
234. McKenzie FR, Pouyssegur J. 1996. cAMP-mediated growth inhibition in fibroblasts is not mediated via mitogen-activated protein (MAP) kinase (ERK) inhibition. cAMP-dependent protein kinase induces a temporal shift in growth factor-stimulated MAP kinases. *J Biol Chem* 271(23):13476-83
235. McNeill JH, Yuen VG, Dai S, Orvig C. 1995. Increased potency of vanadium using organic ligands. *Mol Cell Biochem* 153(1-2):175-80
236. McNeill JH, Yuen VG, Hoveyda HR, Orvig C. 1992. Bis(maltolato)oxovanadium(IV) is a potent insulin mimic. *J Med Chem* 35(8):1489-91

237. Meyerovitch J, Farfel Z, Sack J, Shechter Y. 1987. Oral administration of vanadate normalizes blood glucose levels in streptozotocin-treated rats. Characterization and mode of action. *J Biol Chem* 262(14):6658-62
238. Meyerovitch J, Rothenberg P, Shechter Y, Bonner-Weir S, Kahn CR. 1991. Vanadate normalizes hyperglycemia in two mouse models of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 87(4):1286-94
239. Michaud NR, Fabian JR, Mathes KD, Morrison DK. 1995. 14-3-3 is not essential for Raf-1 function: identification of Raf-1 proteins that are biologically activated in a 14-3-3- and Ras-independent manner. *Mol Cell Biol* 15(6):3390-7
240. Milarski KL, Saltiel AR. 1994. Expression of catalytically inactive Syk phosphatase in 3T3 cells blocks stimulation of mitogen-activated protein kinase by insulin. *J Biol Chem* 269(33):21239-43
241. Millar JB, Russell P. 1992. The cdc25 M-phase inducer: an unconventional protein phosphatase. *Cell* 68(3):407-10
242. Moeller K y Cortesi R. 1991. Insulin-like growth factor-I increases trabecular bone mass in ovariectomized rat. *J. Bone Miner. Res* 6: S221-S225.
243. Mohan S, Baylink DJ. 1991. Bone growth factors. *Clin Orthop*(263):30-48
244. Molero JC, Martinez C, Andres A, Satrustegui J, Carrascosa JM. 1998. Vanadate fully stimulates insulin receptor substrate-1 associated phosphatidyl inositol 3-kinase activity in adipocytes from young and old rats. *FEBS Lett* 425(2):298-304
245. Molinuevo MS, Barrio DA, Cortizo AM, Etcheverry SB. 2004. Antitumoral properties of two new vanadyl(IV) complexes in osteoblasts in culture: role of apoptosis and oxidative stress. *Cancer Chemother Pharmacol* 53(2):163-72
246. Mongold JJ, Cros GH, Vian L, Tep A, Ramanadham S, Siou G, Diaz J, McNeill JH, Serrano JJ. 1990. Toxicological aspects of vanadyl sulphate on diabetic rats: effects on vanadium levels and pancreatic B-cell morphology. *Pharmacol Toxicol* 67(3):192-8

247. Mooney RA, Bordwell KL, Luhowskyj S, Casnellie JE. 1989. The insulin-like effect of vanadate on lipolysis in rat adipocytes is not accompanied by an insulin-like effect on tyrosine phosphorylation. *Endocrinology* 124(1):422-9
248. Morrison DK, Cutler RE. 1997. The complexity of Raf-1 regulation. *Curr Opin Cell Biol* 9(2):174-9
249. Mountjoy KG, Flier JS. 1990. Vanadate regulates glucose transporter (Glut-1) expression in NIH3T3 mouse fibroblasts. *Endocrinology* 127(4):2025-34
250. Mukherjee SP. 1980. Mediation of the antilipolytic and lipogenic effects of insulin in adipocytes by intracellular accumulation of hydrogen peroxide. *Biochem Pharmacol* 29(9):1239-46
251. Munoz P, Guma A, Camps M, Furriols M, Testar X, Palacin M, Zorzano A. 1992. Vanadate stimulates system A amino acid transport activity in skeletal muscle. Evidence for the involvement of intracellular pH as a mediator of vanadate action. *J Biol Chem* 267(15):10381-8
252. Nakai M, Watanabe H, Fujiwara C, Kakegawa H, Satoh T, Takada J, Matsushita R, Sakurai H. 1995. Mechanism on insulin-like action of vanadyl sulfate: studies on interaction between rat adipocytes and vanadium compounds. *Biol Pharm Bull* 18(5):719-25
253. Nantel A, Mohammad-Ali K, Sherk J, Posner BI, Thomas DY. 1998. Interaction of the Grb10 adapter protein with the Raf1 and MEK1 kinases. *J Biol Chem* 273(17):10475-84
254. Narda GE, Vega ED, Pedregosa JC, Etcheverry SB, Baran EJ (1992) Über die wechselwirkung des vanadyl (IV)-kations mit calcium hydroxylapatit. *Naturforsch* 47b, 395 - 398.
255. Nemsadze OD. 1977. [Effect of the trace element vanadium on reparative regeneration of bone tissue in the mandible]. *Stomatologiya (Mosk)* 56(6):1-5
256. Neri LM, Borgatti P, Capitani S, Martelli AM. 2002. The nuclear phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway: a new second messenger system. *Biochim Biophys Acta* 1584(2-3):73-80

257. Nielsen FH. 1985. The importance of diet composition in ultratrace element research. *J Nutr* 115(10):1239-47
258. Nielsen FH. 1990. New essential trace elements for the life sciences. *Biol Trace Elem Res* 26-27:599-611
259. Nielsen FH. 1995. Vanadium in Mammalian Physiology and Nutrition. En *Metal Ions in Biological Systems. Vanadium and its role in life*, pp 543 - 573. Editores: Sigel H and Sigel A. New York. Marcel Dekker, INC.
260. Nielsen FH. 1998. The nutritional Essentiality and Physiological Metabolism of Vanadium in Higher Animals. En *Vanadium Compounds. Chemistry, biochemistry, and therapeutic applications*, pp: 297 - 307. Editores: Tracey AS and Crans DC. Washington, DC. American Chemical Society.
261. Nikoulina SE, Ciaraldi TP, Mudaliar S, Mohideen P, Carter L, Henry RR. 2000. Potential role of glycogen synthase kinase-3 in skeletal muscle insulin resistance of type 2 diabetes. *Diabetes* 49(2):263-71
262. Ninfali P, Accorsi A, Fazi A, Palma F, Fornaini G. 1983. Vanadate affects glucose metabolism of human erythrocytes. *Arch Biochem Biophys* 226(2):441-7
263. Noda M, Rodan GA. 1986. Type-beta transforming growth factor inhibits proliferation and expression of alkaline phosphatase in murine osteoblast-like cells. *Biochem Biophys Res Commun* 140(1):56-65
264. Novak-Hofer I, Thomas G. 1985. Epidermal growth factor-mediated activation of an S6 kinase in Swiss mouse 3T3 cells. *J Biol Chem* 260(18):10314-9
265. Nriagu JO, Pirrone N. 1998. Emission of Vanadium into the Atmosphere. *Vanadium in the Environment. Chemistry and biochemistry*, 30: 25 - 36. Editor: Nriagu JO. New York Wiley J & Sons, INC.
266. Nriagu JO. 1998. History, Occurrence, and Uses of Vanadium. *Vanadium in the Environment. Chemistry and biochemistry*, 30: 1 - 24. Editor: Nriagu JO. New York Wiley J & Sons, INC.

267. Nxumalo F, Tracey AS, Detich N, Gresser MJ, and Ramachandran C. 1998. A New Class of Insulin-Mimetic Compounds. N,N-Dimethylhydroxamidovanadates: Aspects oh Their Chemistry and Function. En Metal Ions in Biological Systems. Vanadium and its role in life, 31: 259276. Editores: Sigel H and Sigel A. New York. Marcel Dekker, INC
268. Okajima T, Nakamura K, Zhang H, Ling N, Tanabe T, Yasuda T, Rosenfeld RG. 1992. Sensitive colorimetric bioassays for insulin-like growth factor (IGF) stimulation of cell proliferation and glucose consumption: use in studies of IGF analogs. *Endocrinology* 130(4):2201-212
269. Pandey SK, Anand-Srivastava MB, Srivastava AK. 1998. Vanadyl sulfate-stimulated glycogen synthesis is associated with activation of phosphatidylinositol 3-kinase and is independent of insulin receptor tyrosine phosphorylation. *Biochemistry* 37(19):7006-14
270. Pandey SK, Chiasson JL, Srivastava AK. 1995. Vanadium salts stimulate mitogen-activated protein (MAP) kinases and ribosomal S6 kinases. *Mol Cell Biochem* 153(1-2):69-78
271. Pandey SK, Theberge JF, Bernier M, Srivastava AK. 1999. Phosphatidylinositol 3-kinase requirement in activation of the ras/C-raf-1/MEK/ERK and p70(s6k) signaling cascade by the insulinomimetic agent vanadyl sulfate. *Biochemistry* 38(44):14667-75
272. Paris S, Pouyssegur J. 1987. Further evidence for a phospholipase C-coupled G protein in hamster fibroblasts. Induction of inositol phosphate formation by fluoroaluminate and vanadate and inhibition by pertussis toxin. *J Biol Chem* 262(5):1970-6
273. Partridge NC, Alcorn D, Michelangeli VP, Ryan G, Martin TJ. 1983. Morphological and biochemical characterization of four clonal osteogenic sarcoma cell lines of rat origin. *Cancer Res* 43(9):4308-14
274. Paternain JL, Domingo JL, Gomez M, Ortega A, Corbella J. 1990. Developmental toxicity of vanadium in mice after oral administration. *J Appl Toxicol* 10(3):181-6
275. Pawson T, Scott JD. 1997. Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. *Science* 278(5346):2075-80

276. Payne DM, Rossomando AJ, Martino P, Erickson AK, Her JH, Shabanowitz J, Hunt DF, Weber MJ, Sturgill TW. 1991. Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen-activated protein kinase (MAP kinase). *EMBO J* 10(4):885-92
277. Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH. 2001. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 22(2):153-83
278. Pederson RA, Ramanadham S, Buchan AM, McNeill JH. 1989. Long-term effects of vanadyl treatment on streptozocin-induced diabetes in rats. *Diabetes* 38(11):1390-5
279. Peters KG, Davis MG, Howard BW, Pokross M, Rastogi V, Diven C, Greis KD, Eby-Wilkens E, Maier M, Evdokimov A, Soper S, Genbauffe F. 2003. Mechanism of insulin sensitization by BMOV (bis maltolato oxo vanadium); unliganded vanadium (VO₄) as the active component. *J Inorg Biochem* 96(2-3):321-30
280. Pfeilschifter J, D'Souza SM, Mundy GR. 1987. Effects of transforming growth factor-beta on osteoblastic osteosarcoma cells. *Endocrinology* 121(1):212-8
281. Pfeilshifter J, Oechsner M, Naumann A, Gronwald RG, Minne HW, Zeilger R. 1990. Stimulation of bone matrix apposition in vitro by growth factors: a comparison between insulin-like growth factor-I, platelet derived growth factor and transforming growth factor. *Endocrinology*. 127: 69-75.
282. Phiel CJ, Klein PS. 2001. Molecular targets of lithium action. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41:789-813
283. Phillips TD, Nechay BR, Heidelbaugh ND. 1983. Vanadium: chemistry and the kidney. *Fed Proc* 42(13):2969-73
284. Plyte SE, Hughes K, Nikolakaki E, Pulverer BJ, Woodgett JR. 1992. Glycogen synthase kinase-3: functions in oncogenesis and development. *Biochim Biophys Acta* 1114(2-3):147-62
285. Posner BI, Faure R, Burgess JW, Bevan AP, Lachance D, Zhang-Sun G, Fantus IG, Ng JB, Hall DA, Lum BS, et al. 1994. Peroxovanadium compounds. A new class of potent phosphotyrosine phosphatase inhibitors which are insulin mimetics. *J Biol Chem* 269(6):4596-604

286. Posner BI, Yang CR, Shaver A. 1998. Mechanism of Insulin Mimetic Action of Peroxovanadium Compounds. En Vanadium Compounds. Chemistry, Biochemistry, and Therapeutic Applications, pp: 316-328. Editores Tracey A and Crans DC. American Chemical Society, Washington, DC
287. Poucheret P, Gross R, Cadene A, Mantegueti M, Serrano JJ, Ribes G, Cros G. 1995. Long-term correction of STZ-diabetic rats after short-term i.p. VOSO₄ treatment: persistence of insulin secreting capacities assessed by isolated pancreas studies. *Mol Cell Biochem* 153(1-2):197-204
288. Poucheret P, Verma S, Grynpas MD, McNeill JH. 1998. Vanadium and diabetes. *Mol Cell Biochem* 188(1-2):73-80
289. Pugazhenth S, Angel JF, Khandelwal RL. 1991a. Long-term effects of vanadate treatment on glycogen metabolizing and lipogenic enzymes of liver in genetically diabetic (db/db) mice. *Metabolism* 40(9):941-6
290. Pugazhenth S, Khandelwal RL, Angel JF. 1991b. Insulin-like effect of vanadate on malic enzyme and glucose-6-phosphate dehydrogenase activities in streptozotocin-induced diabetic rat liver. *Biochim Biophys Acta* 1083(3):310-2
291. Quarles LD, Hartle JE 2nd, Middleton JP, Zhang J, Arthur JM, Raymond JR. 1994. Aluminum-induced DNA synthesis in osteoblasts: mediation by a G-protein coupled cation sensing mechanism. *J Cell Biochem* 56(1):106-17
292. Quarles LD, Hartle JE 2nd, Siddhanti SR, Guo R, Hinson TK. 1997. A distinct cation-sensing mechanism in MC3T3-E1 osteoblasts functionally related to the calcium receptor. *J Bone Miner Res* 12(3):393-402
293. Quarles LD, Haupt DM, Davidai G, Middleton JP. 1993. Prostaglandin F₂ alpha-induced mitogenesis in MC3T3-E1 osteoblasts: role of protein kinase-C-mediated tyrosine phosphorylation. *Endocrinology* 132(4):1505-13
294. Quarles LD, Yohay DA, Lever LW, Caton R, Wenstrup RJ. 1992. Distinct proliferative and differentiated stages of murine MC3T3-E1 cells in culture: an in vitro model of osteoblast development. *J Bone Miner Res* 7(6):683-92

295. Radike M, Warshawsky D, Caruso J, Goth-Goldstein R, Reilman R, Collins T, Yaeger M, Wang J, Vela N, Olsen L, Schneider J. 2002. Distribution and accumulation of a mixture of arsenic, cadmium, chromium, nickel, and vanadium in mouse small intestine, kidneys, pancreas, and femur following oral administration in water or feed. *J Toxicol Environ Health A* 65(23):2029-52
296. Ramanadham S, Cros GH, Mongold JJ, Serrano JJ, McNeill JH. 1990. Enhanced in vivo sensitivity of vanadyl-treated diabetic rats to insulin. *Can J Physiol Pharmacol* 68(4):486-91
297. Ramanadham S, Heyliger C, Gresser MJ, Tracey AS, McNeill JH. 1991. The distribution and half-life for retention of vanadium in the organs of normal and diabetic rats orally fed vanadium(IV) and vanadium(V). *Biol Trace Elem Res* 30(2):119-24
298. Ramanadham S, Mongold JJ, Brownsey RW, Cros GH, McNeill JH. 1989. Oral vanadyl sulfate in treatment of diabetes mellitus in rats. *Am J Physiol* 257(3 Pt 2):H904-11
299. Ramasarma T, Crane FL. 1981. Does vanadium play a role in cellular regulation? *Curr Top Cell Regul* 20:247-301
300. Randazzo PA, Olshan JS, Bijivi AA, Jarett L. 1992. The effect of orthovanadate on phosphoinositide metabolism in NIH 3T3 fibroblasts. *Arch Biochem Biophys* 292(1):258-65
301. Reddy RL, Reddy BV, Reddy PR. 1989. Effects of vanadyl sulphate on ornithine decarboxylase and progesterone levels in the ovary of rat. *Biochem Int* 18(2):467-74
302. Rehder D. 1995. Inorganic considerations on the function of vanadium in biological systems. *En Metal Ions in Biological Systems. Vanadium and its role in life*, 31: 31-44. Editores: Sigel H and Sigel A. New York. Marcel Dekker, INC
303. Reszka AA, Seger R, Diltz CD, Krebs EG, Fischer EH. 1995. Association of mitogen-activated protein kinase with the microtubule cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(19):8881-5
304. Robinson MJ, Cobb MH. 1997. Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol* 9(2):180-6

305. Robinson MJ, Stippec SA, Goldsmith E, White MA, Cobb MH. 1998. A constitutively active and nuclear form of the MAP kinase ERK2 is sufficient for neurite outgrowth and cell transformation. *Curr Biol* 8(21):1141-50
306. Roden M, Liener K, Furnsinn C, Prskavec M, Nowotny P, Steffan I, Vierhapper H, Waldhausl W. 1993. Non-insulin-like action of sodium orthovanadate in the isolated perfused liver of fed, non-diabetic rats. *Diabetologia* 36(7):602-7
307. Rohrschneider L, Rosok MJ. 1983. Transformation parameters and pp60src localization in cells infected with partial transformation mutants of Rous sarcoma virus. *Mol Cell Biol* 3(4):731-46
308. Rosenberg B, VanCamp L, Trosko JE, Mansour VH. 1969. Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. *Nature* 222(191):385-6
309. Rossetti L, Lauglin MR. 1989. Correction of chronic hyperglycemia with vanadate, but not with phlorizin, normalizes in vivo glycogen repletion and in vitro glycogen synthase activity in diabetic Robinson KA. 1981. Concerning the form of biochemically active vanadium. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 212(1186):65-84
310. Rossomando AJ, Payne DM, Weber MJ, Sturgill TW. 1989. Evidence that pp42, a major tyrosine kinase target protein, is a mitogen-activated serine/threonine protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(18):6940-3
311. Robinson KA. 1981. Concerning the form of biochemically active vanadium. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 212(1186):65-84
312. Sabbioni E, Pozzi G, Devos S, Pintar A, Casella L, Fischbach M. 1993. The intensity of vanadium(V)-induced cytotoxicity and morphological transformation in BALB/3T3 cells is dependent on glutathione-mediated bioreduction to vanadium(IV). *Carcinogenesis* 14(12):2565-8
313. Sabbioni E, Pozzi G, Pintar A, Casella L, Garattini S. 1991. Cellular retention, cytotoxicity and morphological transformation by vanadium(IV) and vanadium(V) in BALB/3T3 cell lines. *Carcinogenesis* 12(1):47-52
314. Sakurai H, Tsuchiya K, Nukatsuka M, Sofue M, Kawada J. 1990. Insulin-like effect of vanadyl ion on streptozotocin-induced diabetic rats. *J Endocrinol* 126(3):451-9

315. Salice VC, Cortizo AM, Gomez Dumm CL, Etcheverry SB. 1999. Tyrosine phosphorylation and morphological transformation induced by four vanadium compounds on MC3T3E1 cells. *Mol Cell Biochem* 198(1-2):119-28
316. Sanchez D, Ortega A, Domingo JL, Corbella J. 1991. Developmental toxicity evaluation of orthovanadate in the mouse. *Biol Trace Elem Res* 30(3):219-26
317. Santos RF, Nomizo R, Bopsco A, Wajchenberg BL, Reaven GM, Azhar S. 1997. Effect of metformin on insulin-stimulated tyrosine kinase activity of erythrocytes from obese women with normal glucose tolerance. *Diabetes Metab* 23(2):143-8
318. Scrivens PJ, Alaoui-Jamali MA, Giannini G, Wang T, Loignon M, Batist G, Sandor VA. 2003. Cdc25A-inhibitory properties and antineoplastic activity of bisperoxovanadium analogues. *Mol Cancer Ther* 2(10):1053-9
319. Schaap D, van der Wal J, Howe LR, Marshall CJ, van Blitterswijk WJ. 1993. A dominant-negative mutant of raf blocks mitogen-activated protein kinase activation by growth factors and oncogenic p21ras. *J Biol Chem* 268(27):20232-6
320. Schafer G. 1983. Biguanides. A review of history, pharmacodynamics and therapy. *Diabete Metab* 9(2):148-63
321. Scheid MP, Schubert KM, Duronio V. 1999. Regulation of bad phosphorylation and association with Bcl-x(L) by the MAPK/Erk kinase. *J Biol Chem* 274(43):31108-13
322. Schoeder HA, Balassa JJ, Tipton IH. 1963. Abnormal Trace Metals In Man-Vanadium. *J Chronic Dis* 16:1047-71
323. Schonwasser DC, Marais RM, Marshall CJ, Parker PJ. 1998. Activation of the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway by conventional, novel, and atypical protein kinase C isotypes. *Mol Cell Biol* 18(2):790-8
324. Seger R, Ahn NG, Posada J, Munar ES, Jensen AM, Cooper JA, Cobb MH, Krebs EG. 1992. Purification and characterization of mitogen-activated protein kinase activator(s) from epidermal growth factor-stimulated A431 cells. *J Biol Chem* 267(20):14373-81
325. Seglen PO, Gordon PB. 1981. Vanadate inhibits protein degradation in isolated rat hepatocytes. *J Biol Chem* 256(15):7699-701

326. Seiler HG. 1995. Analytical Procedures for the Determination of Vanadium in Biological Materials. En *Metal Ions in Biological Systems. Vanadium and its role in life*, pp 671 - 688. Editores: Sigel H and Sigel A. New York. Marcel Dekker, INC.
327. Sekar N, Li J, He Z, Gefel D, Shechter Y. 1999. Independent signal-transduction pathways for vanadate and for insulin in the activation of glycogen synthase and glycogenesis in rat adipocytes. *Endocrinology* 140(3):1125-31
328. Sekar N, Li J, Shechter Y. 1996. Vanadium salts as insulin substitutes: mechanisms of action, a scientific and therapeutic tool in diabetes mellitus research. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 31(5-6):339-59
329. Sereday M, Olivera EM y Gagliardino JJ. 1998. Criterios de diagnóstico y clasificación de la diabetes. Su impacto socioeconómico. En *Diabetes Tipo 2 No insulino dependiente: Su diagnóstico, control y tratamiento*, pp: 13-24. Editado por la Sociedad Argentina de Diabetes A.C. Coordinadores Gagliardino JJ y Fabiano A.
330. Setyawati IA, Thompson KH, Yuen VG, Sun Y, Battell M, Lyster DM, Vo C, Ruth TJ, Zeisler S, McNeill JH, Orvig C. 1998. Kinetic analysis and comparison of uptake, distribution, and excretion of ⁴⁸V-labeled compounds in rats. *J Appl Physiol* 84(2):569-75
331. Shaver A, Ng JB, Hall DA, Posner BI. 1995. The chemistry of peroxovanadium compounds relevant to insulin mimesis. *Mol Cell Biochem* 153(1-2):5-15
332. Shechter Y, Eldberg Shisheva A, Gefel D, Sekar N, Quian S, Bruk R, Gershonov E, Crand DC, Goldwasser Y, Fridkin M, Li J. 1998. Insulin-like Effects of Vanadium, Reviewing in Vivo and in Vitro Studies and Mechanisms of Action. En *Vanadium Compounds. Chemistry, Biochemistry, and Therapeutic Applications*, pp: 308-315. Editores Tracey A and Crans DC. American Chemical Society, Washington, DC
333. Shechter Y, Karlisch SJ. 1980. Insulin-like stimulation of glucose oxidation in rat adipocytes by vanadyl (IV) ions. *Nature* 284(5756):556-8
334. Shechter Y. 1990. Insulin-mimetic effects of vanadate. Possible implications for future treatment of diabetes. *Diabetes* 39(1):1-5
335. Shepherd PR, Withers DJ, Siddle K. 1998. Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling. *Biochem J* 333 (Pt 3):471-90

336. Shi X, Jiang H, Mao Y, Ye J, Saffiotti U. 1996a. Vanadium(IV)-mediated free radical generation and related 2'-deoxyguanosine hydroxylation and DNA damage. *Toxicology* 106(1-3):27-38
337. Shi X, Wang P, Jiang H, Mao Y, Ahmed N, Dalal N. 1996b. Vanadium(IV) causes 2'-deoxyguanosine hydroxylation and deoxyribonucleic acid damage via free radical reactions. *Ann Clin Lab Sci* 26(1):39-49
338. Shiba T. 2003. Improvement of insulin resistance by a new insulin secretagogue, nateglinide--analysis based on the homeostasis model. *Diabetes Res Clin Pract* 62(2):87-94
339. Shisheva A, Shechter Y. 1992a. A cytosolic protein tyrosine kinase in rat adipocytes. *FEBS Lett* 300(1):93-6
340. Shisheva A, Shechter Y. 1992b. Quercetin selectively inhibits insulin receptor function in vitro and the bioresponses of insulin and insulinomimetic agents in rat adipocytes. *Biochemistry* 31(34):8059-63
341. Shisheva A, Shechter Y. 1993. Role of cytosolic tyrosine kinase in mediating insulin-like actions of vanadate in rat adipocytes. *J Biol Chem* 268(9):6463-9
342. Siddhanti SR, Hartle JE 2nd, Quarles LD. 1995. Forskolin inhibits protein kinase C-induced mitogen activated protein kinase activity in MC3T3-E1 osteoblasts. *Endocrinology* 136(11):4834-41
343. Smith DM, Sale GJ. 1988. Evidence that a novel serine kinase catalyses phosphorylation of the insulin receptor in an insulin-dependent and tyrosine kinase-dependent manner. *Biochem J* 256(3):903-9
344. Smith JB. 1983. Vanadium ions stimulate DNA synthesis in Swiss mouse 3T3 and 3T6 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80(20):6162-6
345. Snyder F, Cornatzer WE. 1958. Vanadium inhibition of phospholipid synthesis and sulphydryl activity in rat liver. *Nature* 182(4633):462
346. Souness JE, Maslen C, Scott LC. 1992. Effects of solubilization and vanadate/glutathione complex on inhibitor potencies against eosinophil cyclic AMP-specific phosphodiesterase. *FEBS Lett* 302(2):181-4

347. Sreedhara A, Susa N, Patwardhan A, Rao CP. 1996. One electron reduction of vanadate(V) to oxovanadium(IV) by low-molecular-weight biocomponents like saccharides and ascorbic acid: effect of oxovanadium(IV) complexes on pUC18 DNA and on lipid peroxidation in isolated rat hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 224(1):115-20
348. Srivastava AK, Chiasson JL. 1989. Comparative characterization of receptor and non-receptor associated protein tyrosine kinases. *Biochim Biophys Acta* 996(1-2):13-8
349. Srivastava AK. 2000. Anti-diabetic and toxic effects of vanadium compounds. *Mol Cell Biochem* 206(1-2):177-82
350. Stankiewicz PJ and Tracey A. 1995. Stimulation of Enzyme Activity by Oxovanadium Complexes. En *Metal Ions in Biological Systems. Vanadium and its role in life*, 31: 249-286. Editores: Sigel H and Sigel A. New York. Marcel Dekker, INC
351. Stankiewicz PJ and Tracey AS. 1998. Stimulation of Enzyme Activity by Oxovanadium Complexes. En *Metal Ions in Biological Systems. Vanadium and its role in life*, pp 249 - 285. Editores: Sigel H and Sigel A. New York. Marcel Dekker, INC.
352. Stein GS, Lian JB. 1993. Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype. *Endocr Rev* 14(4):424-42
353. Stern A, Yin X, Tsang SS, Davison A, Moon J. 1993. Vanadium as a modulator of cellular regulatory cascades and oncogene expression. *Biochem Cell Biol* 71(3-4):103-12
354. Stevenson BJ, Rhodes N, Errede B, Sprague GF Jr. 1992. Constitutive mutants of the protein kinase STE11 activate the yeast pheromone response pathway in the absence of the G protein. *Genes Dev* 6(7):1293-304
355. Stewart C, Taylor NA, Green IC, Docherty K, Bailey CJ. 1994. Insulin-releasing pituitary cells as a model for somatic cell gene therapy in diabetes mellitus. *J Endocrinol* 142(2):339-43
356. Strout HV, Vicario PP, Saperstein R, Slater EE. 1989. The insulin-mimetic effect of vanadate is not correlated with insulin receptor tyrosine kinase activity nor phosphorylation in mouse diaphragm in vivo. *Endocrinology* 124(4):1918-24

357. Stumvoll M, Nurjhan N, Perriello G, Dailey G, Gerich JE. 1995. Metabolic effects of metformin in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 333(9):550-4
358. Sturgill TW, Ray LB, Erikson E, Maller JL. 1988. Insulin-stimulated MAP-2 kinase phosphorylates and activates ribosomal protein S6 kinase II. *Nature* 334(6184):715-8
359. Sudo H, Kodama HA, Amagai Y, Yamamoto S, Kasai S. 1983. In vitro differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria. *J Cell Biol* 96(1):191-8
360. Sun H, Charles CH, Lau LF, Tonks NK. 1993. MKP-1 (3CH134), an immediate early gene product, is a dual specificity phosphatase that dephosphorylates MAP kinase in vivo. *Cell* 75(3):487-93
361. Sundaresan M, Yu ZX, Ferrans VJ, Irani K, Finkel T. 1995. Requirement for generation of H₂O₂ for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science* 270(5234):296-9
362. Suzuki A, Guicheux J, Palmer G, Miura Y, Oiso Y, Bonjour JP, Caverzasio J. 2002. Evidence for a role of p38 MAP kinase in expression of alkaline phosphatase during osteoblastic cell differentiation. *Bone* 30(1):91-8
363. Suzuki A, Palmer G, Bonjour JP, Caverzasio J. 1998. Catecholamines stimulate the proliferation and alkaline phosphatase activity of MC3T3-E1 osteoblast-like cells. *Bone* 23(3):197-203
364. Swarup G, Cohen S, Garbers DL. 1982. Inhibition of membrane phosphotyrosyl-protein phosphatase activity by vanadate. *Biochem Biophys Res Commun* 107(3):1104-9
365. Taga T, Senma M, and Osaki K. 1972. The Crystal and Molecular Structure of Trehalose Dihydrate. *Acta Cryst.* B28: 3258-3263
366. Takeuchi Y, Suzawa M, Kikuchi T, Nishida E, Fujita T, Matsumoto T. 1997. Differentiation and transforming growth factor-beta receptor down-regulation by collagen-alpha2beta1 integrin interaction is mediated by focal adhesion kinase and its downstream signals in murine osteoblastic cells. *J Biol Chem* 272(46):29309-16

367. Tamura S, Brown TA, Dubler RE, Lerner J. 1983. Insulin-like effect of vanadate on adipocyte glycogen synthase and on phosphorylation of 95,000 dalton subunit of insulin receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 113(1):80-6
368. Tamura S, Brown TA, Whipple JH, Fujita-Yamaguchi Y, Dubler RE, Cheng K, Lerner J. 1984. A novel mechanism for the insulin-like effect of vanadate on glycogen synthase in rat adipocytes. *J Biol Chem* 259(10):6650-8
369. Taylor JC, Anderson GI, Sutow EJ, Driscoll CF, Mackey DC. 1999. The effects of the coupling of titanium implants and dissimilar metal abutments on osteoblast differentiation in vitro. *Int J Oral Maxillofac Implants* 14(6):785-97
370. Thimmaiah KN, Easton J, Huang S, Veverka KA, Germain GS, Harwood FC, Houghton PJ. 2003. Insulin-like growth factor I-mediated protection from rapamycin-induced apoptosis is independent of Ras-Erk1-Erk2 and phosphatidylinositol 3'-kinase-Akt signaling pathways. *Cancer Res* 63(2):364-74
371. Thomas DM, Hards DK, Rogers SD, Ng KW, Best JD. 1996. Insulin receptor expression in bone. *J Bone Miner Res* 11(9):1312-20
372. Thomas DM, Maher F, Rogers SD, Best JD. 1996. Expression and regulation by insulin of GLUT 3 in UMR 106-01, a clonal rat osteosarcoma cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 218(3):789-93
373. Thompson KH. 1999. Vanadium and diabetes. *Biofactors* 10(1):43-51
374. Thrailkill KM, Siddhanti SR, Fowlkes JL, Quarles LD. 1995. Differentiation of MC3T3-E1 osteoblasts is associated with temporal changes in the expression of IGF-I and IGFBPs. *Bone* 17(3):307-13
375. Tolman EL, Barris E, Burns M, Pansini A, Partridge R. 1979. Effects of vanadium on glucose metabolism in vitro. *Life Sci* 25(13):1159-64
376. Tomiyama K, Nakata H, Sasa H, Arimura S, Nishio E, Watanabe Y. 1995. Wortmannin, a specific phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor, inhibits adipocytic differentiation of 3T3-L1 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 212(1):263-9

377. Toney JH, Murthy MS, Marks TJ. 1985. Biodistribution and pharmacokinetics of vanadium following intraperitoneal administration of vanadocene dichloride to mice. *Chem Biol Interact* 56(1):45-54
378. Tracey AS, Gresser MJ. 1986. Interaction of vanadate with phenol and tyrosine: implications for the effects of vanadate on systems regulated by tyrosine phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(3):609-13
379. Tremollieres F, Mohan S, Baylink DJ, Ribot C. 1994. [Autocrine regulation of cell proliferation and secretion of insulin-like growth factor I (IGF-I) in osteoblastic cell line MC3T3-E1]. *Ann Endocrinol (Paris)* 55(2):95-102
380. Trinder P. 1969. Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen. *J Clin Pathol* 1969 22:158-61
381. Tsiani E, Abdullah N, Fantus IG. 1997. Insulin-mimetic agents vanadate and pervanadate stimulate glucose but inhibit amino acid uptake. *Am J Physiol* 272(1 Pt 1):C156-62
382. Tullberg-Reinert H, Jundt G. 1999. In situ measurement of collagen synthesis by human bone cells with a sirius red-based colorimetric microassay: effects of transforming growth factor beta2 and ascorbic acid 2-phosphate. *Histochem Cell Biol.* 112: 271-276
383. Ueki H, Okuhama R, Sera M, Inoue T, Tominaga N, Morita T. 1992. Stimulatory effect of vanadate on 3',5'-cyclic guanosine monophosphate-inhibited low Michaelis-Menten constant 3',5'-cyclic adenosine monophosphate phosphodiesterase activity in isolated rat fat pads. *Endocrinology* 131(1):441-6
384. Ueki H, Sera M, Tanaka K. 1989. Stimulatory release of lipoprotein lipase activity from rat fat pads by vanadate. *Arch Biochem Biophys* 272(1):18-24
385. Ueno A, Arakaki N, Nishikawa S, Takeda Y. 1987. The potentiations by insulin-stimulating peptide from bovine serum albumin of the effects of insulin mimickers and insulin in stimulating glucose utilization by rat adipocytes. *J Biochem (Tokyo)* 102(5):1003-12
386. Uthus EO, Nielsen FH. 1990. Effect of vanadium, iodine and their interaction on growth, blood variables, liver trace elements and thyroid status indices in rats. *Magnes Trace Elem* 9(4):219-26

387. Van Der Hoeven PC, Van Der Wal JC, Ruurs P, Van Blitterswijk WJ. 2000a. Protein kinase C activation by acidic proteins including 14-3-3. *Biochem J* 347 Pt 3:781-5
388. Van Der Hoeven PC, Van Der Wal JC, Ruurs P, Van Dijk MC, Van Blitterswijk J. 2000b. 14-3-3 isotypes facilitate coupling of protein kinase C-zeta to Raf-1: negative regulation by 14-3-3 phosphorylation. *Biochem J* 345 Pt 2:297-306
389. Van Hoof VO, De Broe ME. 1994. Interpretation and clinical significance of alkaline phosphatase isoenzyme patterns. *Crit Rev Clin Lab Sci* 31(3):197-293
390. Verheijen MH, Defize LH. 1995. Parathyroid hormone inhibits mitogen-activated protein kinase activation in osteosarcoma cells via a protein kinase A-dependent pathway. *Endocrinology* 136(8):3331-7
391. Virdee K, Tolkovsky AM. 1996. Inhibition of p42 and p44 mitogen-activated protein kinase activity by PD98059 does not suppress nerve growth factor-induced survival of sympathetic neurones. *J Neurochem* 67(5):1801-5 (Abstr.)
392. Walker F, Kato A, Gonez LJ, Hibbs ML, Pouliot N, Levitzki A, Burgess AW. 1998. Activation of the Ras/mitogen-activated protein kinase pathway by kinase-defective epidermal growth factor receptors results in cell survival but not proliferation. *Mol Cell Biol* 18(12):7192-204
393. Waskiewicz AJ, Flynn A, Proud CG, Cooper JA. 1997. Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2. *EMBO J* 16(8):1909-20
394. Watkins PB, Whitcomb RW. 1998a. Hepatic dysfunction associated with troglitazone. *N Engl J Med* 338(13):916-7
395. Wei L, Yung BY. 1995. Effects of okadaic acid and vanadate on TPA-induced monocytic differentiation in human promyelocytic leukemia cell line HL-60. *Cancer Lett* 90(2):199-205
396. Werdan K, Bauriedel G, Fischer B, Krawietz W, Erdmann E, Schmitz W, Scholz H. 1982. Stimulatory (insulin-mimetic) and inhibitory (ouabain-like) action of vanadate on potassium uptake and cellular sodium and potassium in heart cells in culture. *Biochim Biophys Acta* 687(1):79-93

397. Wever R, Hemrika W. 1998. Vanadium in Enzymes Vanadium in the Environment. Chemistry and biochemistry, 30: 285 - 306. Editor: Nriagu JO. New York Wiley J & Sons, INC
398. Wice B, Milbrandt J, Glaser L. 1987. Control of muscle differentiation in BC3H1 cells by fibroblast growth factor and vanadate. J Biol Chem 262(4):1810-7
399. Widmann C, Gibson S, Jarpe MB, Johnson GL. 1999. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. Physiol Rev 79(1):143-80
400. Wilkinson MG, Millar JB. 2000. Control of the eukaryotic cell cycle by MAP kinase signaling pathways. FASEB J 14(14):2147-57
401. Williams PA, Etcheverry SB, Baran E. 2000. Characterization of new oxovanadium(IV) complexes of saccharides. Carbohydr Res 329(1):41-7
402. Williams PAM, Barrio DA and Etcheverry SB. 1999. Interactions of vanadil(IV) with Dithiothreitol and Thioglycolic Acid. Their Action on Alkaline Phosphatase Activity. J. Inorg. Biochem. 75: 99-104
403. Williams PA, Barrio DA, Etcheverry SB, Baran EJ. 2004. Characterization of oxovanadium (IV) complexes of D-gluconic and D-saccharic acids and their bioactivity on osteoblast-like cells in culture. J Inorg Biochem 98(2):333-42
404. Wolffenbuttel BH, Gomis R, Squatrito S, Jones NP, Patwardhan RN. 2000. Addition of low-dose rosiglitazone to sulphonylurea therapy improves glycaemic control in Type 2 diabetic patients. Diabet Med 17(1):40-7
405. Wood KW, Sarnecki C, Roberts TM, Blenis J. 1992. ras mediates nerve growth factor receptor modulation of three signal-transducing protein kinases: MAP kinase, Raf-1, and RSK. Cell 68(6):1041-50
406. Wu J, Dent P, Jelinek T, Wolfman A, Weber MJ, Sturgill TW. 1993. Inhibition of the EGF-activated MAP kinase signaling pathway by adenosine 3',5'-monophosphate. Science 262(5136):1065-9

407. Xiao S, Rose DW, Sasaoka T, Maegawa H, Burke TR Jr, Roller PP, Shoelson SE, Olefsky JM. 1994. Syp (SH-PTP2) is a positive mediator of growth factor-stimulated mitogenic signal transduction. *J Biol Chem* 269(33):21244-8
408. Xing J, Kornhauser JM, Xia Z, Thiele EA, Greenberg ME. 1998. Nerve growth factor activates extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase pathways to stimulate CREB serine 133 phosphorylation. *Mol Cell Biol* 18(4):1946-55
409. Yki-Jarvinen H. 1992. Glucose toxicity. *Endocr Rev* 13(3):415-31
410. Yohay DA, Zhang J, Thrailkill KM, Arthur JM, Quarles LD. 1994. Role of serum in the developmental expression of alkaline phosphatase in MC3T3-E1 osteoblasts. *J Cell Physiol* 158(3):467-75
411. Yoshino S, Sullivan SG, Stern A. 1989. Vanadate-mediated oxidation of NADH: description of an in vitro system requiring ascorbate and phosphate. *Arch Biochem Biophys* 272(1):76-80
412. Yuen VG, Orvig C, McNeill JH. 1993. Glucose-lowering effects of a new organic vanadium complex, bis(maltolato)oxovanadium(IV). *Can J Physiol Pharmacol* 71(3-4):263-9
413. Zhang M, Zhou M, Van Etten RL, Stauffacher CV. 1997. Crystal structure of bovine low molecular weight phosphotyrosyl phosphatase complexed with the transition state analog vanadate. *Biochemistry* 36(1):15-23
414. Zhang Z, Chen F, Huang C, Shi X. 2002. Vanadate induces G2/M phase arrest in p53-deficient mouse embryo fibroblasts. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 21(3):223-31
415. Zhang Z, Huang C, Li J, Leonard SS, Lanciotti R, Butterworth L, Shi X. 2001. Vanadate-induced cell growth regulation and the role of reactive oxygen species. *Arch Biochem Biophys* 392(2):311-20
416. Zhang ZY. 1998. Protein-tyrosine phosphatases: biological function, structural characteristics, and mechanism of catalysis. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 33(1):1-52
417. Zheng CF, Guan KL. 1993a. Cloning and characterization of two distinct human extracellular signal-regulated kinase activator kinases, MEK1 and MEK2. *J Biol Chem* 268(15):11435-9

- 418. Zheng CF, Guan KL. 1993b. Dephosphorylation and inactivation of the mitogen-activated protein kinase by a mitogen-induced Thr/Tyr protein phosphatase. J Biol Chem 268(22):16116-9
- 419. Zheng CF, Guan KL. 1993c. Properties of MEKs, the kinases that phosphorylate and activate the extracellular signal-regulated kinases. J Biol Chem 268(32):23933-9
- 420. Zhou G, Bao ZQ, Dixon JE. 1995. Components of a new human protein kinase signal transduction pathway. J Biol Chem 270(21):12665-9

**PUBLICACIONES A LAS QUE HA DADO ORIGEN EL PRESENTE TRABAJO
DE TESIS.**

PUBLICACIONES A LAS QUE HA DADO ORIGEN EL PRESENTE TRABAJO DE TESIS.

Cortizo AM, Barrio DA, Etcheverry SB 1996. Vanadium compounds alter cell proliferation and differentiation on cultured osteoblast-like cells.. En: Metal Ions in Biology and Medicine Vol 4, pp 294-297. P. Collery, J.Corbella, JL Domingo, JC Etienne, JM Llobet (Eds). Paris: John Libbey Eurotext. (Trabajo invitado para su publicación).

Barrio DA, Braziunas MD, Etcheverry SB, Cortizo AM. 1997. Maltol complexes of vanadium (IV) and (V) regulate in vitro alkaline phosphatase activity and osteoblast-like cell growth. J Trace Elem Med Biol 11(2):110-5

P.A.M. Williams, D.A. Barrio, S.B. Etcheverry 1999. Interactions of vanadil(IV) with Dithiothreitol and Thioglycolic Acid. Their Action on Alkaline Phosphatase Activity.. J. Inorg. Biochem. 75: 99-104

Etcheverry SB, Williams PA, Barrio DA, Salice VC, Ferrer EG, Cortizo AM. 2000. Synthesis, characterization and bioactivity of a new VO₂⁺/aspirin complex. J Inorg Biochem 80(1-2):169-71

S.B. Etcheverry, D.A. Barrio, M.S. Molinuevo, A.M. Cortizo 2000. Mechanisms of action and cytotoxicity of a new vanadyl(IV)/Aspirin complex in osteoblast-like cells.. En: Metal Ions in Biology and Medicine Vol: 6, pp: 495-497. JA Centeno, PH Collery, G Vernet, RB Finkelman, H Gigg, JC Etienne, (eds). Paris: Jones Libbey Eurotext. (Trabajo invitado para su publicación).

Etcheverry SB, Barrio DA, Williams PA, Baran EJ. 2001. On the interaction of the vanadyl(IV) cation with lactose: inhibition effects of vanadyl(IV)/monosaccharide and disaccharide complexes upon alkaline phosphatase activity. Biol Trace Elem Res 84(1-3):227-38

Etcheverry SB, Williams PA, Salice VC, Barrio DA, Ferrer EG, Cortizo AM. 2002. Biochemical properties and mechanism of action of a vanadyl(IV)-aspirin complex on bone cell lines in culture. *Biometals* 15(1):37-49

Susana B. Etcheverry, Daniel A. Barrio, María S. Molinuevo, Ana M. Cortizo 2002. Two new vanadyl(IV) complexes with potential antineoplastic effect on osteoblasts in culture.. *Metal Ions in Biology and Medicine* Vol: 7, pp: 629-632. L Khassanova, PH Collery, I Maynard, Z Khassanova, JC Etienne, (eds). Paris: Jones Libbey Eurotext. (Trabajo invitado para su publicación).

Etcheverry SB, Barrio DA, Cortizo AM, Williams PA. 2002. Three new vanadyl(IV) complexes with non-steroidal anti-inflammatory drugs (Ibuprofen, Naproxen and Tolmetin). Bioactivity on osteoblast-like cells in culture. *J Inorg Biochem* 88(1):94-100

Barrio DA, Williams PA, Cortizo AM, Etcheverry SB. 2003. Synthesis of a new vanadyl(IV) complex with trehalose (TreVO): insulin-mimetic activities in osteoblast-like cells in culture. *J Biol Inorg Chem* 8(4):459-68

Molinuevo MS, Barrio DA, Cortizo AM, Etcheverry SB. 2004. Antitumoral properties of two new vanadyl(IV) complexes in osteoblasts in culture: role of apoptosis and oxidative stress. *Cancer Chemother Pharmacol* 53(2):163-72

Williams PA, Barrio DA, Etcheverry SB, Baran EJ. 2004. Characterization of oxovanadium (IV) complexes of D-gluconic and D-saccharic acids and their bioactivity on osteoblast-like cells in culture. *J Inorg Biochem* 98(2):333-42



Biblioteca Central
Fac. Cs. Exactas
U.N.L.P.

Donación.....

▲.....

Fecha 07-04-05

(av. B.....Inv.....) 57397